



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Hochschule für Angewandte Wissenschaften

Fakultät Life Sciences

Department für Biotechnologie

Bachelor Thesis

Einsatz von FRET-basierten Sensoren zur lokalen
Detektion von Nukleotid-Konzentrationen
an der Zelloberfläche

von
Dorothea Veronika Plundrich
1994590

durchgeführt am
Institut für Immunologie

AG Klinische Immunologie

1. Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Oliver Ullrich
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Friedrich Haag

Hamburg, 04.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Immunregulation durch extrazelluläre Nukleotide.....	3
1.2.1 Regulierung des Immunsystems durch extrazelluläres ATP.....	4
1.2.2 Extrazelluläres Adenosin und der A2A-Rezeptor	6
1.3 Der FRET-Effekt	8
1.4 Die FRET-Sensoren.....	9
1.4.1 Die ATP-Sensoren	9
1.4.2 Der Kalzium-Sensor Cameleon	11
1.4.3 Epac1 und Epac2 zur Messung der cAMP-Konzentration in der Zelle	12
1.5 Das Prinzip der Sniffer-Zellen.....	13
2 Zielsetzung	15
3 Material	16
3.1 Geräte.....	16
3.2 Verbrauchsmaterial.....	17
3.3 Chemikalien.....	17
3.4 Puffer	19
3.5 Medien	19
3.5.1 Zellkulturmedien	19
3.5.2 Bakterienmedien	20
3.6 Enzyme und Puffer	21
3.7 Antikörper.....	21
3.8 Kit-Systeme	22
3.9 Zelllinien.....	22
3.10 Primer	22
3.11 Software.....	23
4 Methoden	24
4.1 Zellkulturmethoden	24
4.1.1 Auftauen von Zellen	24

Inhaltsverzeichnis

4.1.2 Einfrieren von Zellen	24
4.1.3 Zellkultivierung und -passage	24
4.1.4 Sammeln von Überständen	25
4.1.5 Zellzahlbestimmung	25
4.1.6 Transfektion.....	25
4.1.7 Testtransfektion von Super HEK-Zellen.....	26
4.1.8 Retrovirale Transduktion.....	26
4.1.9 Zellvorbereitung für die Durchflusszytometrie	27
4.1.10 Durchflusszytometrie	27
4.1.11 Zell-Sorting	28
4.1.12 Zellkopplungsversuche	28
4.1.13 Messung der FRET-Kinetik mittels Durchflusszytometrie	29
4.2 Molekularbiologische Methoden	29
4.2.1 Restriktionsverdau.....	29
4.2.2 Dephosphorylierung des Vektors	30
4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	30
4.2.4 Ligation	31
4.2.5 Transformation.....	31
4.2.6 Retranformation.....	32
4.2.7 Sequenzierung.....	32
4.2.8 In-Fusion® Klonierung.....	32
4.2.9 PCR.....	34
4.2.10 Aufreinigen von DNA.....	35
4.2.11 Analyse von Nukleinsäuren	36
4.2.12 SDS-Page.....	37
4.2.13 Western Blot.....	37
4.2.14 Aminolink.....	39
4.2.15 Aufreinigung der Sensorproteine mittels Aminolink-Sepharose-Beads	39
5 Ergebnisse	41
5.1 Analyse von ATPFS1-transfizierten HEK-Zellen.....	41
5.2 Klonierung von ATPFS2-Konstrukten in pMXs-IP.....	46
5.3 In-Fusion® Klonierungen.....	48
5.3.1 In-Fusion® Klonierung eines ProteinG-Tags	48
5.3.2 In-Fusion® Klonierung von Nanobody-Tags	51

5.4 Produktionsanalyse verschiedener Zellsysteme	56
5.4.1 HEK-Zellen vs. sp2/0-Zellen	56
5.4.2 HEK-Zellen vs. Super-HEK-Zellen	58
5.5 Herstellung von Adenosin- und ATP-Sniffer-Zellen	60
5.5.1 Herstellung von ATP-reaktiven Sniffer-Zellen	60
5.5.2 Herstellung von Adenosin-reaktiven Sniffer-Zellen	62
5.5.3 Klonierung von bicistronischen Expressionskonstrukten.....	63
6 Diskussion der Ergebnisse	66
6.1 Analyse von ATPFS1 transfizierten HEK-Zellen	66
6.2 In-Fusion® Klonierungen.....	66
6.3 In-Fusion® Klonierung verschiedener Nanobody-Tags zur Kopplung der Sensoren an die Zelloberfläche	67
6.4 Produktionsanalyse verschiedener Zellsysteme	67
6.5 Herstellung von Adenosin- und ATP-Sniffer-Zellen	69
6.5.1 Herstellung von ATP-reaktiven Sniffer-Zellen	69
6.5.2 Herstellung von Adenosin-reaktiven Sniffer-Zellen	70
7 Zusammenfassung und Ausblick	71
Literaturverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
Anhang	XII
Danksagung.....	XIV
Eidesstattliche Erklärung	XV

Abkürzungsverzeichnis

ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
ARTC2	ADP-Ribosyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CADO	2-Chloroadenosine
CDR3	Complementarity determining region
CFP	Cyan Fluorescent Protein
BSA	Bovin serum albumin
bp	base pairs
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
Fc	crystallisable fragment
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
FSC	Forward Scatter
GFP	Green fluorescent protein
HEK	Human embryonic kidney cells
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
H ₂ O	Wasser
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
jetPEI	Polyethylenimin
kDa	Kilo Dalton
LB	lysogeny broth

Abkürzungsverzeichnis

mA	Milliampere
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
µL	Mikroliter
min	Minute
NC	Nitrocellulose
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
P2X7	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SSC	Side Scatter
TBS	Tris Buffered Saline
TAE	Tri-acetate-EDTA
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VIS	visible
YFP	Yellow Fluorescent Protein

1 Einleitung

Innerhalb der Zelle kommen Nukleotide in hohen Konzentrationen vor und erfüllen viele lebenswichtige Funktionen. Kommt es allerdings zu einem drastischen Anstieg der Nukleotidkonzentration im Bereich außerhalb der Zelle, so wird dies gemeinhin als Gefahrensignal interpretiert, welches dazu dient, das Immunsystem in Alarmbereitschaft zu versetzen und gleichzeitig verschiedene Entzündungsreaktionen zu vermitteln^{1,2}. Dieses Signal zu erkennen und vor allem richtig zu interpretieren ist besonders wichtig, da die vermittelten Reaktionen unter der Beteiligung vieler verschiedener Mitspieler stattfinden. Die in dieser Arbeit verwendeten FRET-Biosensoren wurden dafür entwickelt, um die Anwesenheit verschiedener Metaboliten in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung sichtbar zu machen und bieten somit eine Möglichkeit, die Umstände, unter denen es zu einem Anstieg der extrazellulären Nukleotidkonzentration kommt, genauer zu erforschen. Der Fokus dieser Arbeit lag deswegen zum einen auf einer Optimierung der bereits vorhandenen Sensorproteine und zum anderen auf der Entwicklung eines neuen Detektionssystems, den Adenosin- bzw. ATP-Sniffer-Zellen.

1.1 Das Immunsystem

Die menschliche Gesundheit ist ständig einer Vielzahl verschiedener Gefahren ausgesetzt, weswegen eine intakte Immunantwort essentiell wichtig für eine erfolgreiche Abwehr ist. Das Immunsystem ist ein komplexer Apparat aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen und Molekülen, der dazu dient, den Körper vor diesen gesundheitsgefährdenden Eindringlingen zu schützen, indem es diese erkennt, in Schach hält und im Idealfall vollständig eliminiert. Gleichzeitig muss die Immunantwort so kontrolliert ablaufen, dass keine körpereigenen Strukturen attackiert werden, es muss also zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden werden. Deswegen ist die Selbstregulation des Immunsystems eine seiner wichtigsten Funktionen. Sie vermeidet im gesunden Organismus Fehl- bzw. Überreaktionen, wie Allergien und Autoimmunerkrankungen. Eine weitere wichtige Eigenschaft des Immunsystems ist seine Gedächtnisfunktion, die es nach dem ersten überstandenen Kontakt mit einem bestimmten Antigen entwickelt. Bei einem erneuten Angriff von ein und demselben Krankheitserreger ist der Körper nun in der Lage schneller und gezielter auf diesen zu reagieren³.

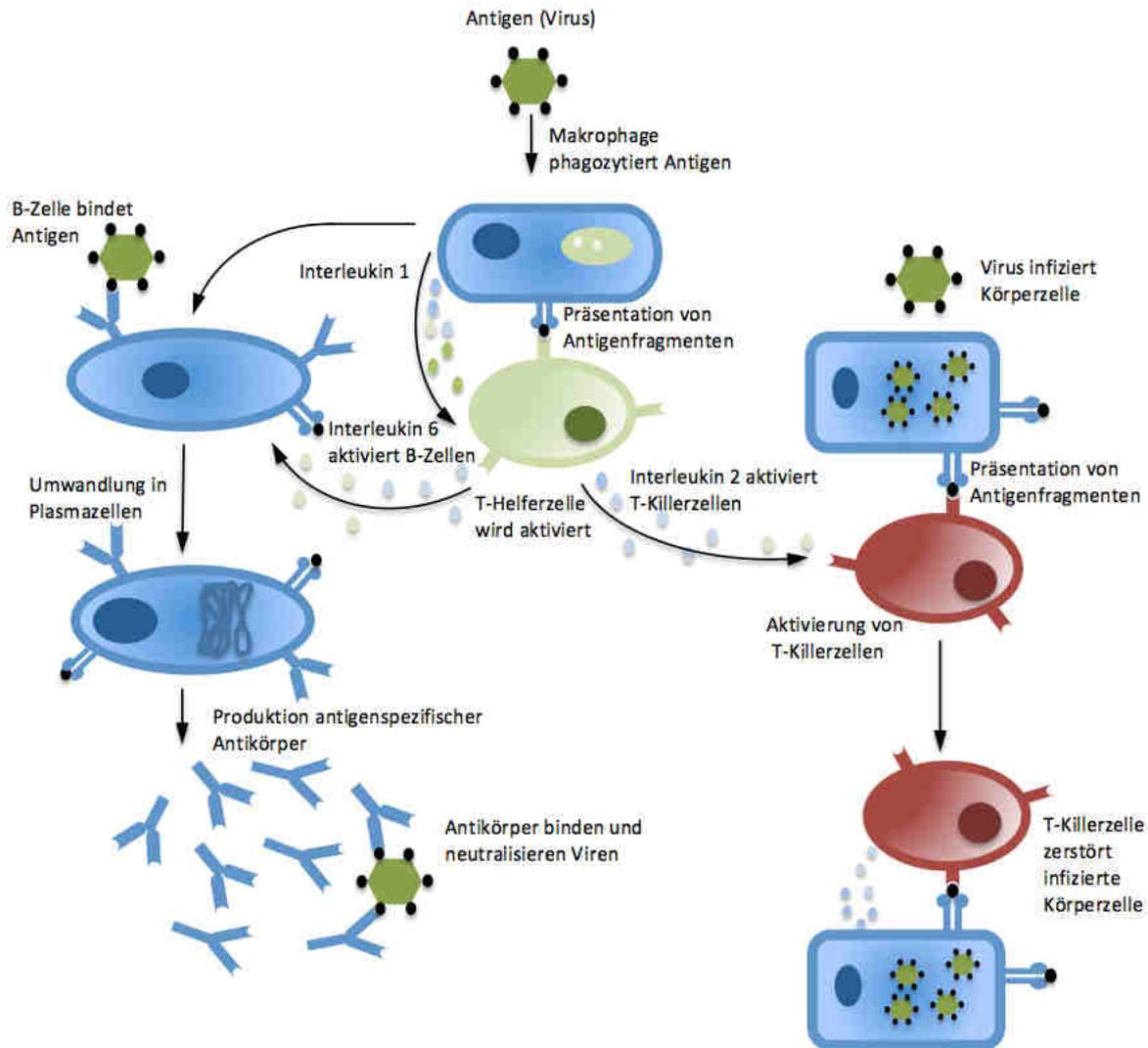


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Immunabwehr im menschlichen Körper. Wird der Organismus durch infektiöse Materialien (Antigen, grün) angegriffen, werden diese durch ihre spezifischen Oberflächenmoleküle von Immunzellen als körperfremde Stoffe entlarvt. Antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen und Makrophagen nehmen die erkannten Antigene durch Phagozytose in sich auf, um im Anschluss Bruchstücke eben dieser Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Durch die Bindung einer T-Helferzelle an dieses Antigenfragment erfolgt deren Aktivierung, was zur Ausschüttung von Interleukinen führt. Die Aktivierung von B-Zellen erfolgt entweder durch die Freisetzung von Interleukinen oder durch die direkte Bindung von Antigenen an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Dieser Stimulus führt dazu, dass sich die B-Zelle zur Plasmazelle, deren Aufgabe die Produktion von Antikörpern ist, ausdifferenziert. Antikörper binden spezifisch an Antigene und blockieren deren pathogene Wirkung (links). Schafft es ein Antigen direkt in eine Zelle einzudringen, können diese in gleicher Weise, wie oben beschrieben, auf der Oberfläche der infizierten Zelle präsentiert werden. Durch die Bindung von T-Zellen an diese präsentierten Antigene oder durch Interleukinausschüttung, entwickeln sich T-Zellen zu T-Killerzellen. Diese sind durch ihre Oberflächenrezeptoren in der Lage, Antigenfragmente auf der Zelloberfläche zu erkennen und für die Zerstörung der infizierten Zellen zu sorgen³. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

Bei der humanen Immunantwort muss zwischen angeborenem Immunsystem, bei der die Abwehr erregerspezifisch ist, und erworbener Immunabwehr, die aufgrund der Gedächtniseigenschaft des Immunsystems erregerspezifisch abläuft, unterschieden werden. Zusätzlich muss zwischen der zellulären und humoralen Immunantwort differenziert werden, wobei unter ersterer alle zellulären Bestandteile, die im Gewebe und in den Blut- und

Lymphgefäßen zirkulieren, zusammengefasst sind. Die humorale Immunantwort besteht aus verschiedenen Makromolekülen, die im Blut- und Lymphsystem vorkommen. Zu diesem Teil des Immunsystems zählen Interleukine, das Komplementsystem und Antikörper. Interleukine sind Peptidhormone, die als Botenstoffe zwischen den Zellen des Immunsystems fungieren und für die Zell-zu-Zell-Kommunikation zwischen Immunzellen gebildet werden. Das Komplementsystem, welches Teil der angeborenen Immunantwort ist, ist ein System, das aus über 30 Plasmaproteinen besteht. Diese werden in der Regel von der Leber synthetisiert und zirkulieren in ihrer inaktiven Form im Blut. Verschiedene Stimuli setzen eine Kaskade in Gange, an deren Ende die Aktivierung eines Zell-zerstörenden-Membrankomplexes steht. Die wohl wichtigste Rolle bei der humoralen Immunantwort haben allerdings die Antikörper. Durch ihre spezifische Bindung an Pathogene sind sie zum einen in der Lage, diese selbst zu neutralisieren, andererseits markieren sie diese, um Phagozyten auf sie aufmerksam zu machen.

Die angeborene Immunabwehr startet sehr schnell nach Kontakt mit einem infektiösen Organismus. Dem gegenüber steht die adaptive Immunantwort, die sich beim ersten Kontakt mit einem Antigen erst über einen längeren Zeitraum entwickelt, dann aber in der Lage ist, diese aufgrund der höheren Spezifität gegen den Eindringling viel effizienter zu bekämpfen. Durch das adaptive Immunsystem wird eine sofortige Neuinfizierung verhindert, gleichzeitig sorgt es für eine langanhaltende Immunität, die den Körper selbst Jahre später bei erneutem Kontakt mit diesem Antigen schützen kann³.

1.2 Immunregulation durch extrazelluläre Nukleotide

Im intrazellulären Raum kommen Nukleotide in hohen Konzentrationen vor und erfüllen dort verschiedene lebensnotwendige Aufgaben als Energieträger oder regulatorische Einheiten der Zelle⁴. Außerhalb der Zelle findet man sie unter normalen Bedingungen nur in äußerst geringen Konzentrationen vor, da sie dort durch extrazelluläre Enzyme einem ständigen Abbauprozess ausgesetzt sind². Inzwischen ist klar, dass Nukleotide auch außerhalb der Zelle eine wichtige Rolle einnehmen, sei es als Metaboliten oder Liganden für verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Eine stark erhöhte Ausschüttung von Nukleotiden, wie sie im Fall von zellulärem Stress oder Entzündungsreaktionen der Fall ist, wird als ein Gefahrensignal interpretiert, das im Zusammenspiel mit verschiedenen purinergen Rezeptoren die Zellen des Immunsystems mobilisieren kann^{2,5}. Abhängig von der Konzentration und dem jeweiligen Rezeptor werden so durch extrazelluläre Nukleotide eine Vielzahl verschiedener

Reaktionen stimuliert. So kann ATP sowohl einen pro-, als auch einen anti-inflammatorischen Effekt auf Zellen des Immunsystems haben⁶⁻⁹, wohingegen Adenosin zumeist anti-inflammatorisch wirkt^{10,11}.

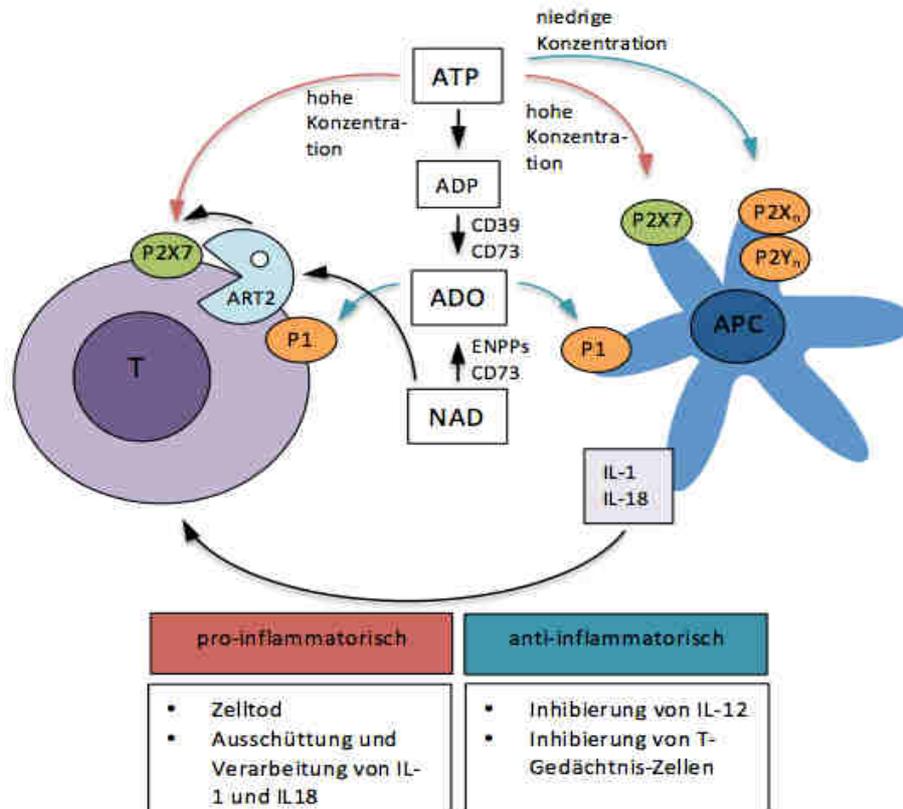


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zusammenspiels zwischen extrazellulären Purin-Nukleotiden und Immunzellen. Durch verletztes Gewebe oder Entzündungsreaktionen kommt es zur Ansammlung von ATP und NAD im extrazellulären Raum, welche von verschiedenen Rezeptoren an der Oberfläche von Immunzellen erkannt werden. Man unterscheidet dabei zwei Arten von Rezeptortypen. Die P1-Rezeptoren, zu denen der A2A-Rezeptor gehört, werden durch Adenosin aktiviert und wirken hauptsächlich anti-inflammatorisch auf das Immunsystem. Die Rezeptoren der P2-Familie, zu denen P2X und P2Y gehören, werden durch die Anwesenheit von extrazellulärem ATP stimuliert. Hohe Konzentrationen dieses Nukleotids führten zu einer Aktivierung des P2X7-Rezeptors, welcher z.B. durch die Sekretion und Verarbeitung von verschiedenen Interleukinen, pro-inflammatorisch auf antigenpräsentierende Zellen (APC) und T-Zellen wirkt. Neben ATP wird P2X7 auf T-Zellen auch durch die ADP-Ribosyltransferase ARTC2 in Anwesenheit von NAD aktiviert. In geringen Konzentrationen aktiviert ATP die anderen P2-Rezeptoren und damit die anti-inflammatorische Herabregulation von T-Helfer-Zellen. Neben P1- und P2-Rezeptoren spielen verschiedene extrazelluläre Enzyme wie CD39, CD73, ARTC1 und ARTC2 eine Rolle, da sie in der Lage sind Purine zu verschiedenen Metaboliten wie ADP, AMP oder Adenosin zu verstoffwechseln². Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

1.2.1 Regulierung des Immunsystems durch extrazelluläres ATP

Adenosintriphosphat kommt als universelle Energiewährung auf natürliche Weise in jeder Zelle des menschlichen Körpers vor¹¹. Zusätzlich hat es eine wichtige Funktion in der Zell-zu-Zell-Kommunikation inne. Die intrazelluläre Konzentration von ATP ist mit 3-10 mM sehr hoch, wohingegen extrazelluläre Konzentrationen sehr gering sind. Die physiologische ATP-Konzentration außerhalb der Zelle befindet sich in der Regel im Bereich von 400 bis 700 nM¹². Dieses Konzentrationsgefälle kann sich durch verschiedene Umstände dramatisch

ändern und zu einem Anstieg der extrazellulären Konzentration von ATP führen. Ursachen eines solchen Anstiegs können zum Beispiel Entzündungsreaktionen, Durchblutungsstörungen oder oxidativer Stress sein¹¹. Die bloße Anwesenheit von ATP im extrazellulären Raum allein entscheidet allerdings noch nicht über die letztlich durch das Molekül vermittelte Reaktion. Diese wird durch eine Vielzahl von membrangebundenen Rezeptoren bestimmt, die durch die Bindung von ATP aktiviert werden und für verschiedene physiologische Funktionen verantwortlich sind¹¹. Diese purinergen Rezeptoren gehören der Familie der P2-Rezeptoren an. Diese werden wiederum in zwei große Gruppen unterteilt, den G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren und den Liganden-gesteuerten Ionenkanälen P2X².

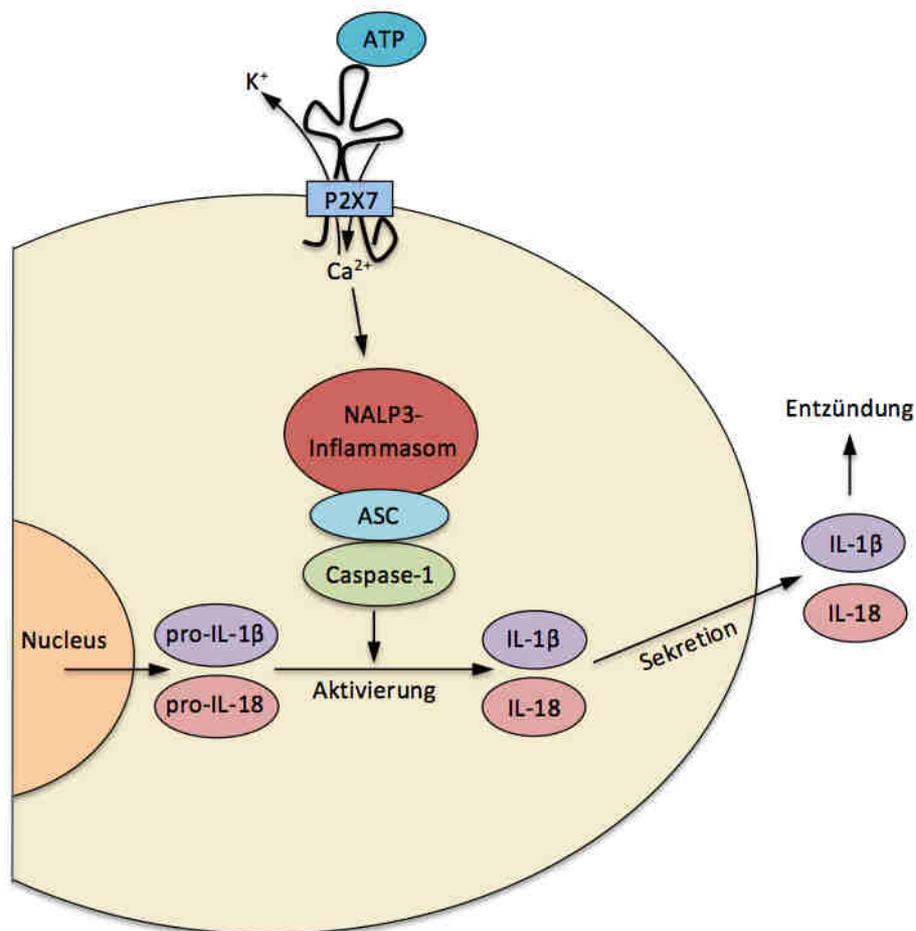


Abbildung 3: Pro-inflammatorischer Effekt durch Prozessierung von IL-1 β und IL-18. IL-1 β und IL-18 sind zwei verwandte Zytokine, die mit Entzündungsreaktionen im Körper assoziiert sind und deren Aktivierung und Ausschüttung durch extrazelluläres ATP und den P2X7-Rezeptor vermittelt werden^{14,50}. Die Stimulation des Rezeptors durch extrazelluläres ATP führt neben einem Kalziumeinstrom zu einer Freisetzung von intrazellulärem Kalium. Der Verlust von intrazellulärem Kalium und dessen Ansammlung im extrazellulären Raum führt neben anderen Signalen zur Aktivierung eines Inflammasoms, welches für die Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β und IL-18 nötig ist. Das Inflammasom ist ein Multiproteinkomplex der angeborenen Immunantwort. Caspase-1 wird innerhalb dieses Komplexes durch Interaktion mit ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD*) durch Proteolyse aktiviert. Durch Caspase-1 werden die Vorstufen von IL-1 β und IL-18 (pro-IL-1 β /pro-IL-18) so geschnitten, dass sie in ihrer biologisch aktiven Form vorliegen⁵¹. So prozessiert werden IL-1 β und IL-18 von der Zelle ins Gewebe sekretiert, wo sie an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

Als einer der am besten charakterisierten Rezeptoren dieser Familie, spielt P2X7 eine wichtige Rolle in der ATP-vermittelten Immunregulation. Durch seine eher geringe Sensitivität gegenüber seines Liganden benötigt der Rezeptor ATP-Konzentrationen, die sich im mikromolaren Bereich befinden¹³. Kommt es allerdings zu einer Bindung, führt diese meist zu pro-inflammatorischen Reaktionen, wie der Ausschüttung von Interleukin- (IL-) 1 β ¹⁴ und IL-18 in antigenpräsentierenden Zellen^{2,7,11,15}, zusätzlich ist er ein Auslöser von Apoptose in T-Zellen^{2,7}.

1.2.2 Extrazelluläres Adenosin und der A2A-Rezeptor

Adenosin ist ein Purin-Nukleosid, das im Körper eine wichtige Rolle spielt. Extrazellulär findet man Adenosin unter physiologischen Bedingungen konstant in sehr geringen Konzentrationen von unter 1 μ M vor. Entzündungsreaktionen lassen die extrazelluläre Adenosin-Konzentration auf 4-10 μ M ansteigen¹⁶.

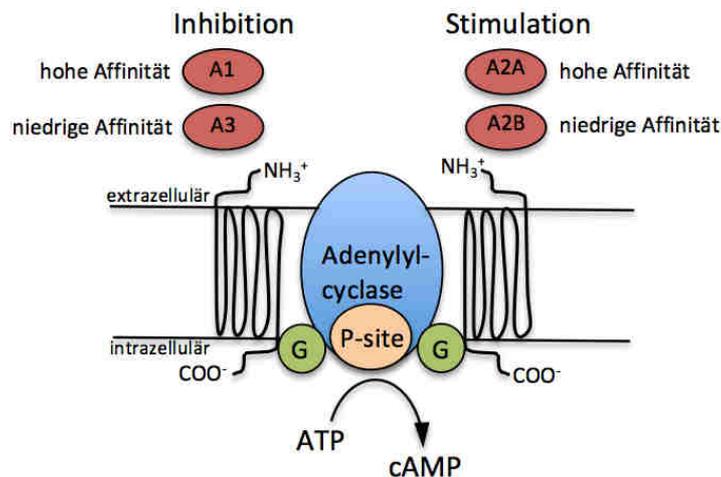


Abbildung 4: Systematische Darstellung von Adenosin-Rezeptoren und ihrer Kopplung mit der Adenylylcyclase. Adenosin-Rezeptoren gehören zur Familie von helikalen, transmembranen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese Rezeptoren binden extrazelluläres Adenosin mit hoher und niedriger Affinität und können durch diese Bindung entweder eine Stimulation oder Inhibition der Adenylylcyclase bewirken. Die Adenylylcyclase besteht aus zwei regulierenden und zwei katalytischen Einheiten und generiert unter ATP-Verbrauch cyclisches AMP als second Messenger. Intrazelluläres Adenosin kann durch Bindung an die P-Stelle (P-site) eine Inhibierung des Enzyms bewirken. Genauere Mechanismen sind allerdings noch nicht erforscht²⁰. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

Adenosin reguliert eine Vielzahl verschiedener physiologischer Reaktionen durch die Bindung an spezifische Rezeptoren¹⁷. Adenosin-Rezeptoren gehören zur P1-Klasse der purinergen Rezeptoren¹⁸. Es gibt vier verschiedene Typen von Adenosin-Rezeptoren, ADORA1 (A1), ADORA2A (A2A), ADORA2B (A2B) und ADORA3 (A3). Die Bindung an einen dieser Rezeptoren ist verantwortlich dafür, welche Rolle Adenosin im Organismus

spielt¹⁶. Sie sind eng mit der Adenylylcyclase assoziiert und regulieren somit die intrazelluläre cAMP-Konzentration als Reaktion auf Adenosin im extrazellulären Raum¹⁷.

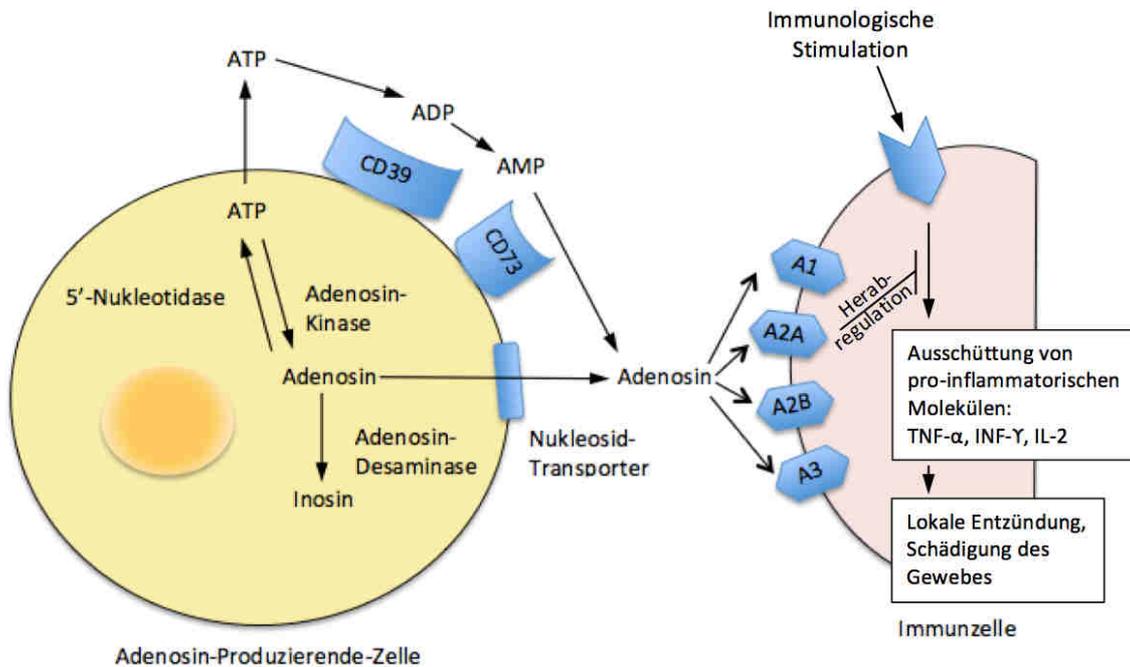


Abbildung 5: Übersicht über den Stoffwechselweg von Adenosin im Körper. Adenosin gelangt hauptsächlich auf zwei Wegen in den extrazellulären Raum. Zum einen entsteht es durch den Abbau von sowohl intrazellulärem, als auch extrazellulärem ATP. Auf diese Weise intrazellulär entstandenes Adenosin gelangt durch membrangebundene Nucleosid-Transporter aus der Zelle heraus. Gleichzeitig wird es durch das Enzym Adenosin-Kinase in der Zelle wieder zu ATP rephosphoryliert, wohingegen die Adenosin-Desaminase es zu Inosin abbaut. Auf dem zweiten Weg wird extrazelluläres Adenosin durch den enzymatischen Abbau von extrazellulärem ATP erzeugt. Diese enzymatische Kaskade besteht aus den beiden Enzymen Ectonucleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase (CD39), welches ATP und ADP zu AMP hydrolysiert und Ecto-5'-Nucleosidase (CD73), welches AMP zu Adenosin umformt. Dieses extrazelluläre Adenosin bindet nun an verschiedene Adenosin-Rezeptoren, A1, A3, A2A und A2B die auf der Oberfläche von Immunzellen exprimiert werden und durch welche die unterschiedlichen Reaktionen an denen extrazelluläres Adenosin im Organismus beteiligt ist, bestimmt werden. Adenosin bindet mit hoher Affinität an den A2A-Rezeptor auf aktivierten Immunzellen und führt durch seine Kopplung an die Adenylylcyclase zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. cAMP bewirkt als second Messenger eine Herabregulation des inflammatorischen Signalweges und unterbricht somit die Entstehung von pro-inflammatorischen Prozessen, wie die Ausschüttung von INF- γ , TNF- α sowie IL-2 und wirkt somit lokalen Entzündungs- und Gewebeschäden entgegen^{20,24}. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

A1 und A3 besitzen eine inhibierende Wirkung auf die Adenylylcyclase, wohingegen A2A und A2B positiv mit ihr gekoppelt sind. Daher führt die Signalübertragung von A2A und A2B zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle^{19,20}. Auf der Basis von verschiedenen Studien wird deutlich, dass A2A-Rezeptoren die größte Rolle bei der Adenosin-vermittelten Immunregulation spielen, indem sie anti-inflammatorisch auf Entzündungsreaktionen des Immunsystems reagieren²¹. In entzündeten Regionen, in denen es zur Ansammlung von extrazellulärem Adenosin kommt, verhindert das Nucleotid durch Bindung an A2A zusätzliche Gewebeschädigungen, indem es die Aktivität von Immunzellen unterdrückt. In ähnlicher Weise kann Adenosin im Tumorgewebe lokal die Immunantwort gegen den Tumor

unterdrücken^{22,23}. Dieser immunsuppressive Effekt wird durch die intrazelluläre cAMP-Akkumulation vermittelt, welche durch ein negatives Feedback die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Molekülen herabreguliert^{20,24}. Diese Eigenschaften machen den ADORA2A-Rezeptor zu einem sehr interessanten Mitspieler, wenn es um die Begrenzung von Gewebsschädigungen oder die Steigerung der Tumorabwehr geht.

1.3 Der FRET-Effekt

Die Messung des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen ist eine viel verwendete Methode, um biochemische Vorgänge in lebenden Zellen sichtbar zu machen²⁵. Der FRET-Effekt beschreibt einen Mechanismus, bei dem Energie strahlungslos von einem Fluorophor zu einem Chromophor übertragen wird, wobei sich ersterer in einem angeregten Zustand befindet und als Donor fungiert, der andere als Akzeptor. Letzterer kann zusätzlich zu seinen farbgebenden auch über Fluoreszenzeigenschaften verfügen, diese sind für den FRET-Effekt allerdings nicht entscheidend²⁶. Eine Energieübertragung findet nur dann statt, wenn sich Donor- und Akzeptorprotein in räumlicher Nähe von 1-10 nm zueinander befinden und sich die Emissions- bzw. Anregungsspektren von Donor bzw. Akzeptor überschneiden²⁷. Diese Eigenschaft macht es möglich, die Intensität des FRET-Signals direkt mit einer Konformationsänderung und einer damit einhergehenden räumlichen Annäherung von Donor- und Akzeptormolekül zu korrelieren. Diese FRET-Eigenschaften ermöglichen es, durch verschiedene Sensorsysteme Interaktionen und Änderungen auf molekularer Ebene mit hoher räumlicher Auflösung darzustellen²⁶.

Verschiedene Sensorproteine sind entwickelt worden, um die Anwesenheit unterschiedlichen Metaboliten zu detektieren. Der Aufbau der Sensoren ist dabei im Wesentlichen der gleiche. Eine, das jeweilige Molekül bindende Proteindomäne wird von zwei FRET-Donor- bzw. – Akzeptordomänen flankiert. Durch Anlagerung des passenden Liganden an die Bindungsdomäne kommt es zu einer Konformationsänderung, welche den Abstand zwischen den beiden Fluorophoren entweder verkürzt oder wachsen lässt und dementsprechend zu einer Erhöhung oder einer Abnahme der FRET-Effizienz führt^{26,28,29}.

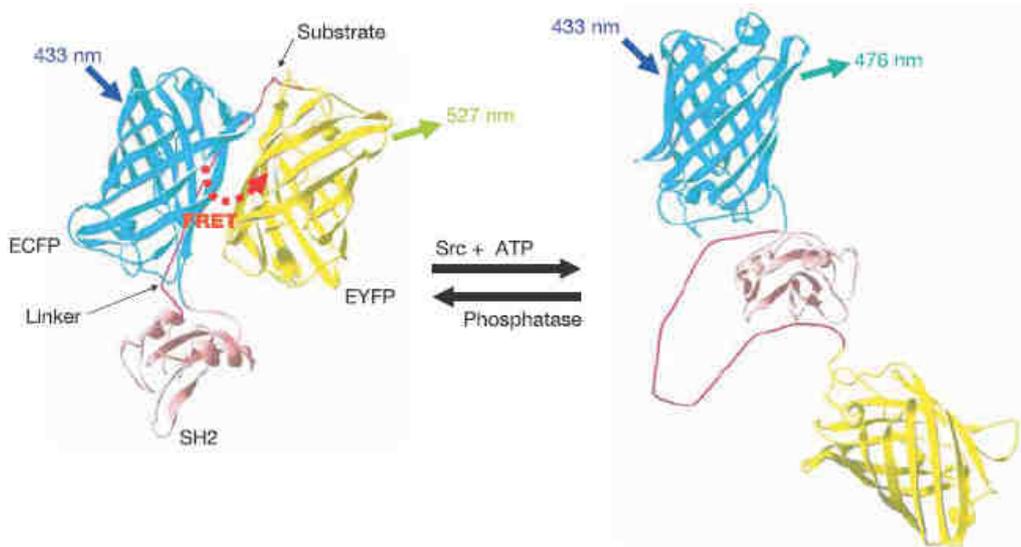


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer FRET-Aktivierung zwischen dem Fluorophorenpaar CFP und YFP am Beispiel eines FRET-Sensors. Durch eine Konformationsänderung des Moleküls, die durch die Bindung eines Liganden an der Bindungs-Domäne des Sensorproteins induziert wird, schwindet der Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül. Durch die nun entstandene räumliche Nähe steigt der FRET-Effekt aufgrund seiner direkten Abhängigkeit zum Abstand der beiden Moleküle. Ein Anstieg der Liganden-Konzentration und ein damit einhergehender Anstieg der FRET-Effizienz, sorgt für eine erhöhte Akzeptor-Emission mit gleichzeitiger Abnahme der Donor-Emission (links). Bei Abnahme der Ligandenkonzentration verhält es sich entsprechend umgekehrt (rechts).Bild: ⁵²

1.4 Die FRET-Sensoren

In dieser Arbeit kamen drei verschiedene FRET-basierte Sensorproteine zum Einsatz, welche in der Lage sind, die Anwesenheit ihres jeweiligen Liganden durch eine Änderung des FRET-Signals sichtbar zu machen. Die beiden ATP-Sensorsysteme ATPFS1 und ATPFS2, der Kalziumsensor Cameleon und die beiden cAMP-Sensoren Epac1 und Epac2.

1.4.1 Die ATP-Sensoren

Um zu verstehen wie ATP an zellulären Prozessen teilnimmt, wurden an der Kyoto Universität in der Arbeitsgruppe von Hiromi Imamura verschiedene, proteinbasierte Biosensoren entwickelt, die eine Detektion dieses Metaboliten in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung möglich machen²⁹.

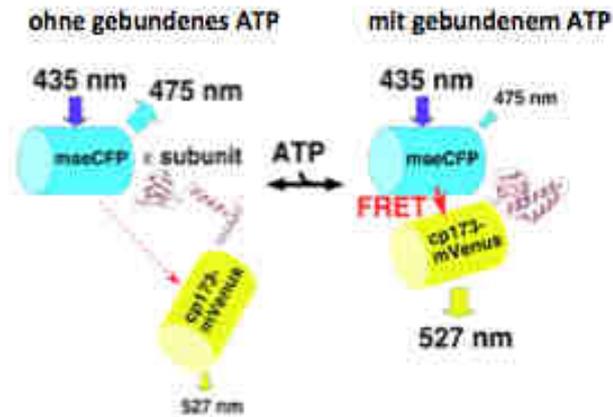


Abbildung 7: Schematische Zeichnung eines ATP-Sensors des Typs ATPFS1. Die Fluorophore CFP (mseCFP) und YFP (cp173-mVenus) sind C- bzw. N-Terminus mit der ϵ -Untereinheit der ATP-Synthase aus *Bacillus subtilis* verknüpft. Donor und Akzeptor werden durch Bindung von ATP in räumliche Nähe zueinander gebracht. Dieses Verhalten führt zu einer Steigerung der FRET-Effizienz und gibt dem Molekül durch die Messbarkeit dieser Änderung seine Sensoreigenschaften. Bild: ²⁹

Für die Entwicklung dieses ATP-Sensors des Typs ATPFS1 wurden eine Variante des Cyan (türkis) fluoreszierenden Proteins, mseCFP (*monomeric super-enhanced CFP*) und mVenus (*monomeric Venus*), eine Variante des gelb fluoreszierenden Proteins YFP, als Donor- und Akzeptor-Paar verwendet. Diese wurden jeweils an den N- bzw. C-Terminus einer ATP-bindenden Domäne angebracht. Diese Domäne ist von der ϵ -Untereinheit der F_0F_1 -ATP-Synthase verschiedener *Bacillus* Spezies abgeleitet. Um bei der Detektion ein möglichst großes Spektrum an ATP-Konzentrationen abdecken zu können, wurden verschiedene ATP-Bindungsdomänen entwickelt, die sich in ihrer Affinität für ATP unterscheiden. Für den Sensor mit der höchsten Affinität wurde die ϵ -Untereinheit aus der thermophilen *Bacillus* Spezies PS3 verwendet. Diese besitzt die Fähigkeit, ATP im niedrigen, mikromolaren Bereich zu binden und wird aufgrund ihrer Herkunft als PS3 bezeichnet. Die Sensoren mit einer Affinität für ATP im millimolaren Bereich wurden mit einer ϵ -Untereinheit versehen, die aus *Bacillus subtilis* stammt. Sensoren mit dieser Bindedomäne erhielten den Namen Bs. Zusätzlich zu diesen beiden ATP-bindenden Domänen wurde eine weitere Domäne erzeugt, die die Fähigkeit zur ATP-Bindung verloren hat und die als Nullkontrolle dient. Hierfür wurden zwei Punktmutationen in die Sequenz der Bs-Domäne eingefügt. An den Stellen 122 und 126 besteht bei einer Bindung des Moleküls an ATP ein direkter Kontakt zwischen zwei Arginin-Resten und den α - und β -Phosphaten des ATPs. Durch Austausch dieser beiden Aminosäuren an den Stellen 122 und 126 mit zwei Lysin verlor die sogenannte RRKK-Variante ihre Affinität zu ATP und kann somit für eine Darstellung des Basis-FRET verwendet werden, der zustande kommt wenn keine Bindung von ATP stattfindet²⁹.

Die Verwendung von CFP und YFP als Fluorophorenpaar, wie es in den meisten FRET-basierten Sensorsystemen der Fall ist, birgt allerdings auch Probleme. Eine ungünstige Eigenschaft dieses FRET-Paars ist, dass die Emission von Donor und Akzeptor einen großen Überlappungsbereich aufweisen. Eine solche Überschneidung führt zu einer Abschwächung der FRET-Ratio, da ein Teil der im Kanal der Akzeptor-Emission gemessenen Fluoreszenz durch direkte Emission des Donors verursacht wird. Deswegen wurden alternative FRET-Paarungen untersucht, die für die vielen Anwendungsbereiche von FRET-Messungen besser geeignet sind.

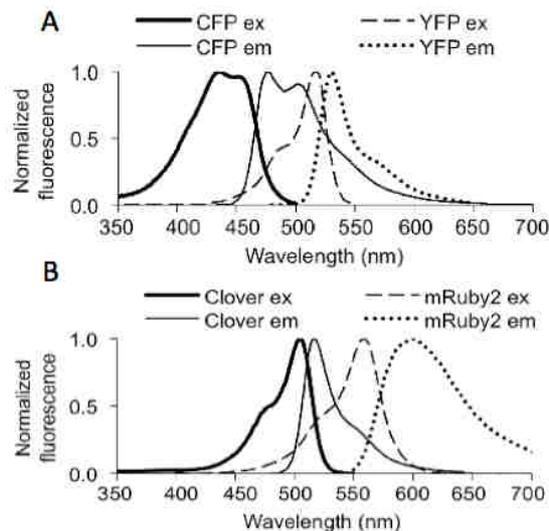


Abbildung 8: Grafische Darstellung der Fluoreszenzspektren der beiden verwendeten Donor-Akzeptor-Paare. Die Emissionsspektren von CFP und YFP weisen zwischen 500 und 550 nm einen sehr großen Überlappungsbereich auf. Diese Überschneidung der beiden Spektren kann bei einer Messung von einer hohen Fehlerbelastung betroffen sein. Um dies zu umgehen, wurde ein neues Fluorophorenpaar an die ATP-Bindedomäne angefügt. Bei diesem neuen Paar, Clover und mRuby2 zeigt sich eine deutlich bessere Trennung der jeweiligen Emissionsspektren. Bild:²⁵

Entwickelt wurden die zwei fluoreszierenden Proteine Clover und mRuby2, die mit der stärksten Grün- bzw. Rotfluoreszenz ausgestattet sind, die bis dahin bei Fluorophoren gemessen wurde²⁵. Konstrukte, die mit diesen beiden Fluoreszenz-Domänen ausgestattet sind werden im Folgenden als ATPFS2 bezeichnet.

1.4.2 Der Kalzium-Sensor Cameleon

Die Anwesenheit von extrazellulärem ATP und die daraus resultierende Aktivierung des P2X7 Rezeptors führt zu einem Anstieg des Kalziumspiegels in der Zelle. Um die Dynamik dieser Konzentrationsänderung messen zu können, wurde der Kalzium-Sensor Cameleon entwickelt³⁰. Die beiden Fluorophor-Domänen CFP und YFP sind bei diesem Sensorsystem

an Calmodulin (CaM), ein Kalzium-bindendes Protein und an eine M13-Domäne gekoppelt. M13 ist ein Peptid, das in Anwesenheit von Kalzium Calmodulin bindet. Die Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, bei der sich die beiden Fluorophore einander annähern, wodurch der FRET-Effekt erhöht wird³¹.

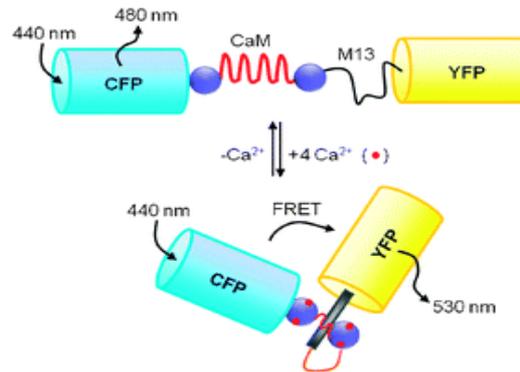


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Cameleon-Sensorproteins zur Detektion von Kalzium. Unter der Verwendung der Bindungsdomäne Calmodulin (CaM) wird in Anwesenheit von Kalzium eine Konformationsänderung induziert. Unter Bindung von Kalzium interagiert Calmodulin mit M13, was Grund für diese Änderung der räumlichen Struktur ist und somit für einen erhöhten Energietransfer zwischen CFP und YFP verantwortlich ist. Bild: ³¹

1.4.3 Epac1 und Epac2 zur Messung der cAMP-Konzentration in der Zelle

Nach dem gleichen Prinzip wie der Kalzium-Sensor Cameleon wurden auch die beiden Sensoren Epac1 und Epac2 (*exchange protein directly activated by cAMP*) konstruiert, um einen Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle verfolgen zu können. Dabei sollen Veränderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration dazu dienen, Veränderungen des Nucleosids Adenosin im extrazellulären Raum anzuzeigen, da Adenosin in Anwesenheit des ADORA2A-Rezeptors zu einem Anstieg von cAMP führt. Wie schon bei den beiden anderen Sensorsystemen, wurde auch hier eine Bindedomäne von den zwei Fluorophorproteinen CFP und YFP flankiert. Als Bindedomäne wurde in diesem Fall humanes Epac verwendet. Anders als bei den Sensoren für ATP und Kalzium führt die Bindung eines Liganden an Epac1 und Epac2 zu einer Konformationsänderung, die den Abstand zwischen CFP und YFP vergrößert. Bei erhöhter cAMP-Konzentration kommt es daher zu einer Verringerung des Energietransfers zwischen CFP und YFP. Die Abnahme der Donorfluoreszenz geht in diesem Fall mit einer Zunahme der Akzeptorfluoreszenz einher. Anhand dieser Eigenschaften können intrazelluläre cAMP-Level direkt anhand der Donor/Akzeptor-Ratio berechnet werden ^{28,32,33}.

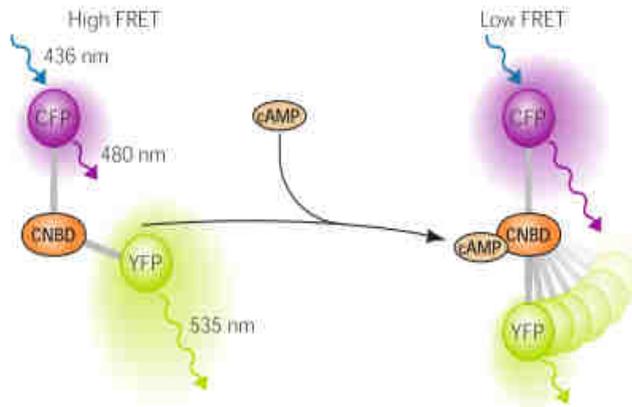


Abbildung 10: Schematische Zeichnung eines cAMP-Sensor-Proteins. Die Sensoren des Typs Epac1 und Epac2 binden cAMP durch eine cyclische Nukleotid-bindende-Domäne (CNBD), die zwischen dem FRET-Donor-Akzeptor-Paar eingefügt wurde. Die Bindung von cAMP an diese Domäne induziert eine Änderung der Konformation im Molekül, welche den Abstand zwischen den beiden Fluorophoren vergrößert und somit zu einer messbaren Verringerung des FRET-Effekts führt. Bild: ³³

1.5 Das Prinzip der Sniffer-Zellen

Ein weiteres Detektionssystem, das in dieser Arbeit untersucht werden sollte und für dessen Entwicklung ebenfalls FRET-Sensoren verwendet wurden, sind die sogenannten Sniffer-Zellen. Sniffer-Zellen sind Biosensoren, mit deren Hilfe extrazelluläre Nukleotide wie ATP und Adenosin direkt nach der Ausschüttung von anderen Zellen mikroskopisch sichtbar gemacht werden sollen. Die Messung beruht darauf, dass die Sensorzellen einen purinergen Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, der eine hohe Affinität für das zu messende Nukleotid aufweist. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt dann in der Sensorzelle eine Änderung der Konzentration eines Metaboliten (Kalzium oder cAMP), die durch Messung der FRET-Effizienz sichtbar gemacht werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl Sniffer-Zellen für die Detektion von ATP als auch von Adenosin, unter Zuhilfenahme verschiedener FRET-basierter Sensorproteine zu entwickeln. Sie sollten es ermöglichen, die Bedingungen, unter denen eine gesteigerte Ausschüttung dieser Moleküle stattfindet, genauer zu untersuchen. Die Bindung von extrazellulärem ATP an den P2X7-Rezeptor führt zu einem gesteigerten Einstrom von Kalzium in die Zelle. Dieser Kalzium-Anstieg kann in der Sniffer-Zelle durch den Kalzium-Sensor Cameleon, durch eine gesteigerte FRET-Effizienz sichtbar gemacht werden. Analog dazu funktioniert das System der Adenosin-Sniffer-Zellen. Hier wird der Anstieg von cAMP durch eine Verringerung des FRET-Effekts des Epac-Sensorsystems aufgezeichnet. Die Sniffer-Zelle detektiert die Anwesenheit von extrazellulären Nukleotiden wie ATP und Adenosin also über die indirekte

Messung einer intrazellulären Konzentrationsänderung der second Messenger Kalzium und cAMP^{34,35}.

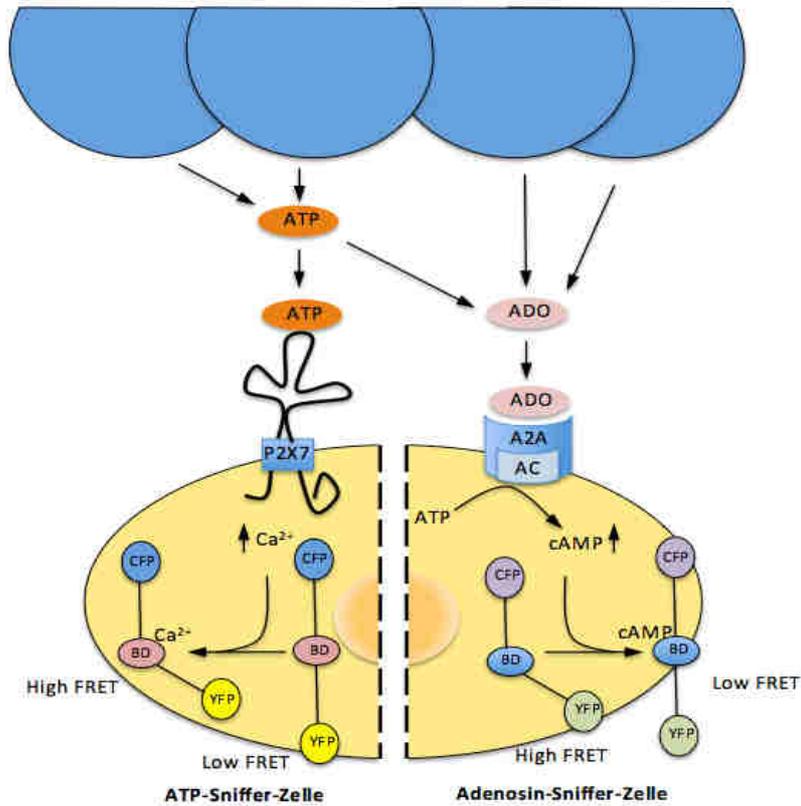


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aktivierung von Sniffer-Zellen durch extrazelluläres ATP und Adenosin. Fibroblasten werden mit einem purinergen Rezeptor (P2X7 oder A2A) sowie mit einem FRET-Sensor (Cameleon oder Epac) kotransfiziert. Die ATP-Sniffer-Zelle (links) reagiert auf Bindung von extrazellulärem ATP an P2X7 mit einem Anstieg von intrazellulärem Kalzium, der durch den Kalzium-Sensor Cameleon detektiert wird. Die Adenosin-Sniffer-Zelle (rechts) reagiert auf die Bindung von Adenosin an den A2A-Rezeptor mit einem Anstieg von cAMP, der durch den cAMP-Sensor Epac detektiert wird. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

2 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, durch den Einsatz von FRET-basierten Sensoren, verschiedene Detektionssysteme für den Nachweis der extrazellulären Nukleotide ATP und Adenosin zu entwickeln. Zum einen sollte mit den bereits etablierten ATP-Sensoren der Gruppe von Hiromi Imamura gearbeitet werden, zum anderen sollte durch die Klonierung zweier bicistronischer Sensor-Rezeptor-Konstrukte die Grundlage für ein neues Detektionssystem für Adenosin und ATP, den sogenannten Sniffer-Zellen, geschaffen werden. Um eine lokale Messung von ATP an der Oberfläche von Zellen zu ermöglichen, sollten die ATP-Sensorproteine durch Anfügen verschiedener Tags, möglichst effizient an verschiedene Zellen gekoppelt werden. Für eine Optimierung von sowohl Sensorproduktion als auch -qualität sollten zusätzlich verschiedene Expressionssysteme auf ihre Effizienz hin untersucht, sowie eine Methode für die Aufreinigung der Proteine entwickelt werden.

3 Material

3.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Sicherheitswerkbank	Thermo scientific, Darmstadt, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	SANYO, Moriguchi, Japan
Pipetboy	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	EVOS, Darmstadt, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld superior, Lauda Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Thermo scientific, Darmstadt, Deutschland
Termocycler	MJ Research Inc., Quebec, Kanada
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
PicoFuge™	Stratagene, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL/LAUDA, Burgwedel, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spannungsgerät	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelkammer	peqlab biotechnology, Erlangen, Deutschland
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Kamera	Edas290 + DC290 Kodak, Rochester, USA
Waage	Satorius, Göttingen, Deutschland
Stratacooler	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Durchflusszytometer	FACS Calibur, FACS CantoII
Entwickler	AGFA HealthCare, Mortsel, Belgien
Entwicklerkassette	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Mikrowelle	Miele, Gütersloh, Deutschland
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Magnetrührer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen 20 µL	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µL	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µL	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Serologische Pipetten 1 mL	Falcon, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipetten 5 mL	Falcon, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipetten 10 mL	Falcon, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipetten 25 mL	Falcon, Franklin Lakes, USA
Mikroreaktionsgefäße 0,2 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 0,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	Thermo scientific, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 mL	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 mL	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 mL	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 mL	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Petrischalen	Thermo scientific, Darmstadt, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten (6 well)	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
SteriCups	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Einmalhandschuhe	Protege, Aurora, USA
CellTris® 30 µm	Symex, Norderstedt, Deutschland
SDS-Gele	Invitrogen, Carlsbad, USA

3.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
DMEM	Gibco, Darmstadt, Deutschland
RPMI	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Gibco, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Gibco, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Non-essential amino acids	Gibco, Darmstadt, Deutschland

Material

Sodium pyruvate	Gibco, Darmstadt, Deutschland
DPBS	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
jetPEI	Polylyus, Freiburg, Deutschland
Isotone NaCl-Lösung 0,9 %	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Polybrene	Santa Cruz Biotech., Heidelberg, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
50x TAE-Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
RotiSafe	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
6x DNA loading dye	Fermentas, Darmstadt, Deutschland
GeneRuler, 1 kB	Fermentas, Darmstadt, Deutschland
Carbenicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Zeocin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Western Blot Detection Reagents	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Methanol	J.T.Baker Chemicals, Center Valley, USA
4x SDS loading Dye	Life Technologies, Carlsbad, USA
MagicMark	Invitrogen, Carlsbad, USA
BSA	Merk, Darmstadt, Deutschland
ATP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D-Glucose	Merk, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merk, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	ICI, London, UK
CADO	Ag Tolosa, Immune regulation, UKE
Forskolin	Tocris bioscience, Bristol, UK

3.4 Puffer

Puffer	Komponenten
MES SDS-Running-Buffer	10 L Aqua dest. 500 mL MES SDS-Running-Buffer (20x)
Blotting Puffer	50 mL Transferpuffer 100 mL Methanol 1 mL Antioxidans 849 mL Aqua dest.
ECS-/-	10 mM Glucose 1 % BSA 15 mM HEPES 140 mM Natriumchlorid 5 mM Kaliumchlorid Aqua dest.
ECS+/-	ECS-/- 1 mM Magnesiumchlorid 1 mM Kalziumchlorid

3.5 Medien

3.5.1 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Komponenten
Einfriermedium	75 % FCS 10 % DMSO 15 % Kulturmedium Steril filtrieren
DMEM – Komplet	500 mL DMEM Medium 5 mL L-Glutamin (100x) 5 mL Sodium Pyruvate (100 mM) 5 mL Non-essential amino acids (100x) 5 mL HEPES 5-10 % FCS

Material

RPMI – Medium	500 mL RPMI 1640 5 mL L-Glutamin (100x) 5 mL Sodium Pyruvate (100 mM) 5-10 % FCS
F17 – Medium	500 mL F17-Medium 10 mL L-Glutamin (4 mM) 5 mL Pluronic (0,1 %) 250 µL G418 5 mL FCS (1 %)
Transfektionsmedium (super HEK)	F17-Medium ohne G418 und FCS
Feeding Medium	250 mL Transfektionsmedium 20 % Trypton

3.5.2 Bakterienmedien

Bezeichnung	Komponenten
LB – Agar	LB-Agar 40 g/L Carbenizillin 1 mL/L
LB – Medium	LB-Medium 25 g/L Carbenizillin 1 m
SOC – Medium (1L)	Bacto-Fryptone 20 g/L Bacto-Yeast extract 5 g/L NaCl 0,5 g/L 1 M KCl 2,5 mL/L, M=74,55 g/mol - bis 800 ml mit H ₂ O auffüllen - pH auf 7,0 mit NaOH einstellen - auf 970 mL mit H ₂ O auffüllen - Autoklavieren 1 M MgCl ₂ 10 mL/L 1 M Glucose 20 mL/L

3.6 Enzyme und Puffer

Enzyme	Enzymaktivität	Hersteller
Restriktionsenzyme		
NcoI	10000 U/mL	New England BioLabs, Ipswich, UK
NheI	10000 U/mL	New England BioLabs, Ipswich, UK
NotI	10000 U/mL	New England BioLabs, Ipswich, UK
PacI	10000 U/mL	New England BioLabs, Ipswich, UK
Sall	200000 U/mL	New England BioLabs, Ipswich, UK
DNA-Polymerase		
KOD-DNA-Polymerase	1000 U/mL	Merk, Darmstadt, Deutschland
Ligase		
T4-DNA-Ligase	100 U/mL	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
5x In-Fusion® HD Enzyme Premix	100 U/mL	Clontech® Laboratories, Inc., Mountain View, USA
Phosphatase		
Antarktische Phosphatase	1 U/mL	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Reaktionspuffer		
Buffer 2		New England BioLabs, Ipswich, UK
Buffer 3.1		New England BioLabs, Ipswich, UK
T4-DNA-Ligase-Puffer		Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

3.7 Antikörper

Bezeichnung	Markierung	Hersteller
s-14-Rb-Fc	unkonj.	AG Nolte, Molekulare Immunologie
antiGFP	unkonj.	Roche, Basel, Schweiz
Goat-anti-Rat	FITC	eBioscience, San Diego, USA
anti-Mouse	HRP	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
s-14-Nanobody	unkonj.	AG Nolte, Molekulare Immunologie
s+16-Nanobody	unkonj.	AG Nolte, Molekulare Immunologie

3.8 Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller
Plasmid Minikit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Nucleo-Spin Gel- and PCR-Cleanup	Macherey-Nagel GmbH Co. KG, Düren, Deutschland
AminoLink® Plus Immobilization Kit	Thermo scientific, Darmstadt, Deutschland
In-Fusion® HD Cloning Kit	Clontech® Laboratories, Inc., Mountain View, USA

3.9 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden von der AG Haag und der Core Facility am Campus Forschung des UKE zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Information
HEK	Adhärente Zellen,
Platinum E	Adhärente Zellen
sp2/0	Suspensionszellen
DC27.10	Suspensionszellen
DC27.10 NOD	Suspensionszellen
Super-HEK-Zellen	Suspensionszellen

3.10 Primer

Primername	5'-3' Sequenz	Annealing Temp.
INF_ProtG-F	GGCGGCTCCGCGGCCGCAACCA CATAACAAGCTCGTGATC	79,41 °C
INF_ProtG-R	ATTTACGTAGCGGCCGCTACT CGGTCACGGTGAAGGT	75,48 °C
INF_s-14-F_DoP	GGCGGCTCCGCGGCCCTCCATGG CCCAGGTGCA	81,31 °C
INF_s-14-R_DoP	ATTTACGTAGCGGCCCTCATTAT GCGGCCCCATTGAGATC	73,11 °C
INF_s+16-F_DoP	ACCCAAGCTGGCTAGCTTAAAC GCCGCCAACATGGGATG	75,21 °C

Material

INF_s+16-R_DoP	CCATGGTGGCGCTAGCGCTGCC GCCGCCACT	79,19 °C
In-Fusion_pCDNA-F	ATGGCCACAACCATGACTATAG GGAGACCCAAGC	71,90 °C
In-Fusion_pCDNA-R	TTATTTTATCGTCGAGGTGACAC TATAGAATAGGGC	66,96 °C
In-Fusion_p2x7-F	TCCTGCAGGCCTCGAGATCCACT AGTCCAGTGTG	74,31 °C
In-Fusion_p2x7-R	CGCGCCGGCCCTCGATAGAAGGC ACAGTCGAGG	78,32 °C

3.11 Software

FlowJo Version 9.4.3

4 Methoden

4.1 Zellkulturmethoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zusätzlich wurden alle unter der Sterilbank verwendeten Materialien mit 70 %-igem Alkohol gesäubert, um Oberflächenkeime zu entfernen.

4.1.1 Auftauen von Zellen

Vor dem Auftauen von Zellen wurde 5 mL Zellkulturmedium in eine T25 Kulturflasche gefüllt und für 30 min bei 37 °C im Brutschrank vorgewärmt. Das Kryoröhrchen mit den gewünschten Zellen wurde aus dem Stickstofftank genommen und für den Transport auf Trockeneis gelagert. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C für 90 s aufgetaut und im Anschluss unter der Sicherheitswerkbank in die vorgewärmte Zellkulturflasche überführt.

4.1.2 Einfrieren von Zellen

Vor dem Einfrieren wurde der Überstand abgenommen und die Zellen, wie vor einer Passage mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Durch die Zugabe von Kulturmedium wurde die Wirkung des Trypsins deaktiviert. Die Zellen wurden abzenrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 mL Einfriermedium resuspendiert. Um die Zellen keinem zusätzlichen Stress auszusetzen, wurden diese ohne weiteres Durchmischen in vorgekühlte und beschriftete Kryoröhrchen überführt und für 24 h in einem Stratacooler bei -80 °C gelagert, bevor sie in den Stickstofftank überführt wurden.

4.1.3 Zellkultivierung und -passage

Die in Kultur befindlichen adhärenenten HEK-Zellen wurden in DMEM-Komplett-Medium in T25- und T75-Zellkulturflaschen im CO₂-Inkubator kultiviert. Der Brutschrank hatte eine konstante Temperatur von 37 °C und einen CO₂-Gehalt von 5 %. Um zu verhindern, dass die Zellen zu dicht wachsen, wurden diese alle drei bis vier Tage gesplittet und in neue Flaschen überführt. Hierfür wurde altes Medium von den Zellen entfernt und diese mit 3 mL PBS gewaschen. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen wurde 1 mL 1x Trypsin/DPBS

zugegeben. Um die Zellen nicht zu schädigen, wurde die Reaktion nach dem vollständigen Ablösen der Zellen, möglichst schnell mit DMEM-Medium gestoppt und die Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt, um sie bei 1300 rpm für 5 min zu zentrifugieren. Nach dem Resuspendieren des Zellpellet in 5 mL frischem Kulturmedium, wurden die Zellen verdünnt in neue Zellkulturflaschen ausplattiert. Die Suspensionszellen wurden entsprechend ihrer Zelldichte in neue Petrischalen mit 12 mL frischem RPMI-Medium überführt. Transfizierte Zellen wurden durch ihre Antibiotikaresistenz weiter selektiert und mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

4.1.4 Sammeln von Überständen

Altes Medium von transfizierten HEK- und sp2/0-Zellen wurde nicht verworfen, sondern zur weiteren Untersuchung gesammelt. Die Überstände wurden abgenommen und in Zentrifugenröhrchen überführt. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden sie für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert und im Anschluss zur Aufbewahrung in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben. Gelagert wurden die Überstände bei 8 °C.

4.1.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurden diese mit Tryphan-Blau angefärbt. Tryphan-Blau ist ein saurer Farbstoff, der an Zellprotein bindet. Tote Zellen besitzen eine defekte Membran und ermöglichen es, dem Farbstoff ins Zellinnere vorzudringen, wodurch sie eine dunkelblaue Färbung erhalten und sich deutlich von den durchscheinenden, lebenden Zellen hervorheben. Für die Färbung wurden 10 µL der Zellsuspension mit 90 µL Tryphan-Blau versetzt. Von dieser Zell-Farblösung wurden 10 µL zwischen die Glasplatten der Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Entsprechend der Verdünnung wurden die gezählten Zellen mit 10^5 multipliziert.

4.1.6 Transfektion

Die verschiedenen Sensorproteine wurden zur Produktion in unterschiedliche Zelllinien eingebracht. Hierfür wurde das Transfektionsreagenz jetPEI verwendet, ein lineares Polyethyleniminderivat, das die DNA mit einer positiven Ladung umschließt, die an

anionische Bestandteile der Zelloberfläche bindet und über Endozytose ins Zellinnere gelangt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen gesplittet, sodass die Konfluenz am Tag der Transfektion ca. 50-60 % betrug. Unter der Sicherheitswerkbank wurden zu 250 μL sterilem NaCl entweder 6 μL jetPEI oder 3 μg DNA gegeben. Nach guter Durchmischung wurde die jetPEI-NaCl-Lösung zu der DNA-Lösung gegeben und nach kurzem Vortexen für 30 min inkubiert. In dieser Zeit wurde das alte Medium der zu transfizierenden Zellen abgenommen und durch frisches ersetzt. Nach der Inkubation wurde die jetPEI-DNA-Lösung langsam auf die Zellen getropft und vorsichtig gemischt, woraufhin sie für bis zu 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 in den Brutschrank gestellt wurden. Der Erfolg der Transfektion wurde mit dem Evos-Fluoreszenzmikroskop und Durchflusszytometrie kontrolliert.

4.1.7 Testtransfektion von Super HEK-Zellen

Vor der Transfektion der Super HEK-Zellen wurden diese mitsamt ihrem Medium aus ihrer Petrischale entnommen, in eine Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1300 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 mL Transfektionsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert, um sie im Anschluss in 10 mL Transfektionsmedium aufzunehmen und in einer neuen Petrischale auszuplattieren. Wie bei der Transfektion von normalen HEK-Zellen erfolgte die Transfektion von Super-HEK-Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz jetPEI. In zwei Mikroreaktionsgefäßen wurden hier anstelle von isotoner Natriumchlorid-Lösung, 250 μL Transfektionsmedium entweder mit 25 μL des Reagenzes oder mit 10 μg der zu transfizierenden DNA gemischt. Nach ausreichender Durchmischung wurde die jetPEI-Lösung zur DNA pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die jetPEI-DNA-Mischung langsam auf die Zellen getropft und durch kreisende Bewegungen in der Petrischale verteilt. Die Zellen wurden danach bei 37 °C und 5 % CO_2 in den Brutschrank gestellt und nach 24 h mit 250 μL Feeding-Medium versorgt. Nach bis zu 5 Tagen wurden die Zellen geerntet und zur Gewinnung des Überstands abzentrifugiert.

4.1.8 Retrovirale Transduktion

Ein retroviraler Vektor wurde dafür verwendet, nichtvirales Genmaterial in eukaryotische Zellen einzubringen. Dafür wurde das gewünschte Gen in einen retroviralen Vektor kloniert, um im Anschluss durch Transfektion in eine eukaryotische Verpackungszelllinie eingebracht

zu werden, welche in dieser Arbeit eine Platinum E Zelllinie war. Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine für die Verpackung der Vektor-DNA her, welche dann in der Lage ist Zellen zu infizieren. 24 h vor der Transduktion wurden sp 2/0 Zellen in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in einer 6-Well Platte mit 2 mL RPMI-Medium kultiviert. Nach 48 h wurde der Überstand der zuvor transfizierten Platinum E Zellen abgenommen und in einem Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 1300 rpm abzentrifugiert, woraufhin der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Das Medium der sp 2/0 Zellen wurde vor der Transduktion entfernt indem es mit den Suspensionszellen in einem Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert für 5 min bei 1300 rpm abzentrifugiert wurden und anschließend verworfen wurde. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Volumina des retroviralen Überstands resuspendiert (2 mL, 1,5 mL, 1mL) und auf 2 mL mit frischem RPMI-Medium aufgefüllt. In jedes Well wurde zusätzlich 1 μ L Polybrene gegeben. Polybrene ist ein kationisches Polymer, das eine effizientere Bindung der viralen Glykoproteine an die Rezeptoren der Zelloberfläche ermöglicht, da es nach Bindung an die Zelloberfläche die dortigen Ladungen neutralisiert. Der Erfolg der Transduktion wurde mit dem Ecos-Fluoreszenzmikroskop und Durchflusszytometrie kontrolliert.

4.1.9 Zellvorbereitung für die Durchflusszytometrie

Vor Analyse mit dem Durchflusszytometer wurden die Zellen von altem Medium befreit, mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Die Zellen wurden für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert und im Anschluss in einer Neubauer Zählkammer gezählt um sie im Anschluss in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen zu verteilen. Um Mediumreste zu entfernen, wurde einmal mit PBS gewaschen. Für eine Kopplung mit Antikörpern wurden diese in einer 1:1000 Verdünnung zu den Zellen pipettiert und für 30 min auf einem Roller bei 4 °C inkubiert. In vielen Versuchen wurde im Anschluss mit einem zweiten Antikörper oder einem Überstand inkubiert. In diesem Fall wurde zwei Mal mit PBS gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Vor dem Messen wurden die Zellen erneut zwei Mal mit PBS gewaschen und für die Messung in 500 μ L PBS aufgenommen.

4.1.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Analyse von Zellen, welche dabei einzeln in hoher Geschwindigkeit an einem Laser vorbei fließen. Es können Eigenschaften wie

Größe, Granularität sowie unterschiedliche Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ermittelt werden. Unabhängig von den Fluoreszenzeigenschaften wird Licht von unterschiedlichen Zellen verschieden gebrochen. Diese Brechung kann von Durchflusszytometer durch zwei Detektoren gemessen werden. Durch das Vorwärtsstreulicht oder *Forward Scatter* (FSC) wird die Größe jeder einzelnen Zelle bestimmt. Das Seitwärtsstreulicht oder *Side Scatter* (SSC) dient zum Messen der Granularität der Zellen. Gleichzeitig können Zellen, die mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern oder direkt mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, detektiert werden. Diese Farbstoffe werden durch einen Laser angeregt und senden auf einer für den jeweiligen Farbstoff charakteristischen Wellenlänge zurück.

4.1.11 Zell-Sorting

Um positive Protein-exprimierende Zellen von negativen zu trennen, wurden diese durch FACS-Sorting voneinander getrennt. Dafür wurden die Zellen abtrypsiniert und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in gentamycinhaltigem Medium resuspendiert. Um Zellagglutination zu verhindern, wurden die Zellen durch ein Zellsieb in ein 15 mL-Falcon-Tube pipettiert. Um eine Anlagerung dieser Zellen an der Wand des Falcon-Tubes zu unterbinden, wurde dieses zuvor mit Medium auf einem Roller beschichtet. Die Zellen wurden auf Eis gelagert an die FACS Sorting Core Unit des UKE gegeben.

4.1.12 Zellkopplungsversuche

Um die Sensorproteine an die Oberfläche von Zellen zu koppeln, wurden diese mit den Zellen inkubiert. Da nicht alle Sensorstrukturen direkt an die Zelloberfläche binden konnten, wurden diese mit einem Antikörper inkubiert, der in der Lage ist die Sensorproteine an ihrem ProteinG-Tag zu binden. Verwendet wurden für diese Kopplung s-14-Rabbit-Fc, welches an die ADP-Ribosyltransferase ARTC2 auf der Zelloberfläche der DC27.10 NOD-Zellen bindet. Bevor die Zellen mit diesem inkubiert wurden, wurden die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und in FACS-Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurden 2 μ L des Rabbit-Fcs auf die Zellen gegeben und diese für 30 min auf einem Roller im Kühlraum inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und 3 Mal mit PBS gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurden 200 μ L des jeweiligen Sensorzellüberstandes auf die Zellen gegeben und ebenfalls für 30 min im Kühlraum auf dem Roller inkubiert. Sensoren mit einem

Nanobody-Tag konnten direkt, ohne vorherige Kopplung an einen Antikörper auf die Zellen gegeben werden. Vor der FACS-Messung wurden die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen und für die Messung in 500 μ L PBS resuspendiert.

4.1.13 Messung der FRET-Kinetik mittels Durchflusszytometrie

Für die Herstellung von ATP bzw. Adenosin reaktiven Sniffer-Zellen wurden HEK-Zellen drei Tage vor der Messung mit dem Cameleon bzw. den Epac1/2-Sensoren und verschiedenen Rezeptorsequenzen kotransfiziert. Am Tag der Messung wurden die Zellen abtrypsinisiert und in FACS-Röhrchen in 600 μ L ECS-/- Puffer resuspendiert. Gleichzeitig wurden FACS-Röhrchen mit jeweils 650 μ L ECS+/+ bei 37 °C bis zur Messung warmgehalten. Die für die Stimulation der verschiedenen Rezeptoren verwendeten Reagenzien wie ATP, Forskolin und CADO wurden auf Eis gelagert. Für die FACS-Messung wurden 50 μ L der Zellsuspension in eins der vorgewärmten FACS-Röhrchen pipettiert und gut gemischt. Für 90 s wurde der Basis-FRET aufgenommen. Danach wurde möglichst schnell eines der jeweiligen Stimulantien in einer bestimmten Konzentrationen zugegeben und wiederum gut durchmischt. In weiteren 90 s wurde nun eine zeitliche Änderung des FRET-Effekts aufgezeichnet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Restriktionsverdau

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann die DNA an bestimmten Stellen innerhalb einer bestimmten Sequenz geschnitten werden. Die Restriktionsschnittstelle ist meist eine kurze Sequenz aus vier bis acht Basenpaaren von palindromischem Charakter. Für den Restriktionsverdau wurde 1 μ g der Vektor-DNA bzw. des Inserts mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Bei der Verwendung von mehr als einem Restriktionsenzym war es wichtig, einen Puffer zu verwenden, der für beide Enzyme kompatibel war.

Ansatz für Restriktion

x μ L Plasmid-DNA

2 μ L Puffer

1 μ L Enzym

y μ L HPLC-H₂O

20 μ L Ansatzvolumen

Der Verdau wurde für drei Stunden bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss erfolgte für 20 min eine Deaktivierung der Enzyme bei 65 °C.

4.2.2 Dephosphorylierung des Vektors

Beim Schneiden von Vektor-DNA entstehen zwei zueinander kompatible Enden, die sich durch Selbstligation wieder miteinander verbinden können. Um dies zu verhindern, wurde nach dem Restriktionsverdau der 5'-Phosphat-Rest des Vektors enzymatisch entfernt. Dafür wurden 1 μ L Antarktische Phosphatase und 2 μ L Phosphatasepuffer zum Restriktionsansatz des Vektors pipettiert und für 1 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wird das Enzym bei 65 °C für 20 min deaktiviert.

4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch die negative Ladung der DNA wandert sie von der Kathode zur Anode, wobei größere Fragmente in dem engmaschigen Netz aus Agarosepolymeren länger zurückgehalten werden als kürzere und dementsprechend weniger weit laufen. Um ein 1 %-iges Agarosegel herzustellen, wurden 0,5 g Agarose in 50 mL 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle in Lösung gebracht. Um DNA-Fragmente anschließend im UV-Licht sichtbar zu machen wurden zusätzlich 2,5 μ L RotiSafe zur gelösten Agarose gegeben. Das abgekühlte Gel wurde in eine Laufkammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 4 μ L 6x Ladepuffer gemischt. Zusätzlich zu den Proben wurden 5 μ L eines 1 kB Gene Rulers auf das Gel aufgetragen. An die Gelkammer wurde für 30 min eine Spannung von 90 V angelegt. Um die Banden im Anschluss sichtbar zu machen wurde das Gel auf eine UV-Platte gelegt.

4.2.4 Ligation

Durch die Ligation wurden die vorher enzymatisch gespalteten Vektor- und Insertfragmente nach deren Aufreinigung und Quantifizierung miteinander verknüpft. Die Reaktion erfolgte unter Zugabe des Enzyms Ligase, welche die Verbindung der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxygruppe der beiden Fragmente katalysiert. Die Reaktion erfolgt unter Verbrauch von ATP. Die eingesetzte Vektormenge betrug 100 ng. Die Menge an Insert-DNA wurde mit der unten stehenden Formel berechnet.

$$I = 100 \text{ ng} * \frac{3}{1} * \frac{\text{Insert bp}}{\text{Vektor bp}}$$

Ansatz für Ligation	Kontrollansatz
x µL Insert-DNA	-
y µL Vektor-DNA	y µL Vektor-DNA
1,5 µL T4-Ligase-Puffer	1,5 µL T4-Ligase-Puffer
1 µL T4-Ligase	1 µL T4-Ligase
z µL HPLC-H ₂ O	z µL HPLC-H ₂ O
15 µL Ansatzvolumen	15 µL Ansatzvolumen

Die Ligationsreaktion fand für 2 h bei Raumtemperatur statt, mit einer anschließenden Enzymdeaktivierung für 20 min bei 65 °C im Heizblock.

4.2.5 Transformation

Zur Vervielfältigung der DNA wurde das Ligationsprodukt mittels Hitzeschocktransformation in kompetente E.coli XL2-blue Bakterien eingebracht. Dafür wurden 5-7 µL des Ligations- bzw. Kontrollansatzes für 20 min mit 50 µL der Bakterien auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock, der für 30 s bei 42 °C im Wasserbad stattfand und durch erneute zweiminütige Inkubationen auf Eis unterbrochen wurde. Durch Zugabe von 250 µL vorgewärmtem SOC-Medium mit anschließender einstündiger Inkubation auf einem Schüttler bei 37 °C wurde den Zellen Zeit zur Regeneration gegeben. Von jedem Ligationsansatz wurden im Anschluss zwei antibiotikahaltige Platten mit je 50 µL und 250 µL ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im

Brutschrank inkubiert. Um die Bildung von Kondenswasser zu verhindern, wurden die Platten invertiert in den Brutschrank gestellt.

4.2.6 Retransformation

Eine Retransformation wurde nach der Sequenzierung mit einem Klon mit der besten Sequenz durchgeführt, um daraus beliebig viele Minipreps herzustellen. Dafür wurde 1 μL des Minipreps dieses Klons mit 50 μL kompetenter *E. coli* XL2-blue Bakterien transformiert. Nachdem die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank waren, wurden nur eine einzelne Kolonie gepickt und für etwa eine Stunde bei 37 °C auf einen Schüttler vorinkubiert. Diese Vorkultur wurde dann auf mehrere Tubes mit antibiotikahaltigem LB-Medium aufgeteilt und zur Übernachtskultur bei 37 °C und 220 rpm in einen Brutschüttler gestellt.

4.2.7 Sequenzierung

Mittels DNA-Sequenzierung kann die unbekannt Sequenz der klonierten Plasmid DNA auf ihre Richtigkeit untersucht werden. Um diese Sequenz zu bestimmen wurde die isolierte Miniprep-DNA in einem Ansatz mit den entsprechenden *forward* und *reverse* Primern und HPLC-H₂O gemischt, der zur Sequenzierung an die Fima Seqlab in Göttingen geschickt wurde.

Ansatz für Sequenzierung

1,5 μg DNA

3 μL *forward/reverse* Primer

x μL HPLC-H₂O

15 μL Ansatzvolumen

4.2.8 In-Fusion® Klonierung

Die In-Fusion® Klonierung ist ein Verfahren für einen schnellen Transfer von verschiedenen Insert-Fragmenten in einen Vektor. Das besondere an dieser Methode ist, dass sie nicht abhängig von übereinstimmenden Restriktionsschnittstellen in den Vektor- und Insert-Fragmenten ist. Vielmehr beruht diese Art von Klonierung auf eigens für die verwendeten Insert- und Vektor-Fragmente entworfenen Primern, die dafür sorgen, dass sich beide DNA-Stränge an beiden Enden mindestens 15 homologe Basenpaare teilen. Zusätzlich erfolgt die

In-Fusion® Ligation mit Hilfe eines Enyms, dass die entsprechenden DNA-Fragmente miteinander verbindet, indem es präzise diese 15 Basenpaare am deren Ende erkennt.

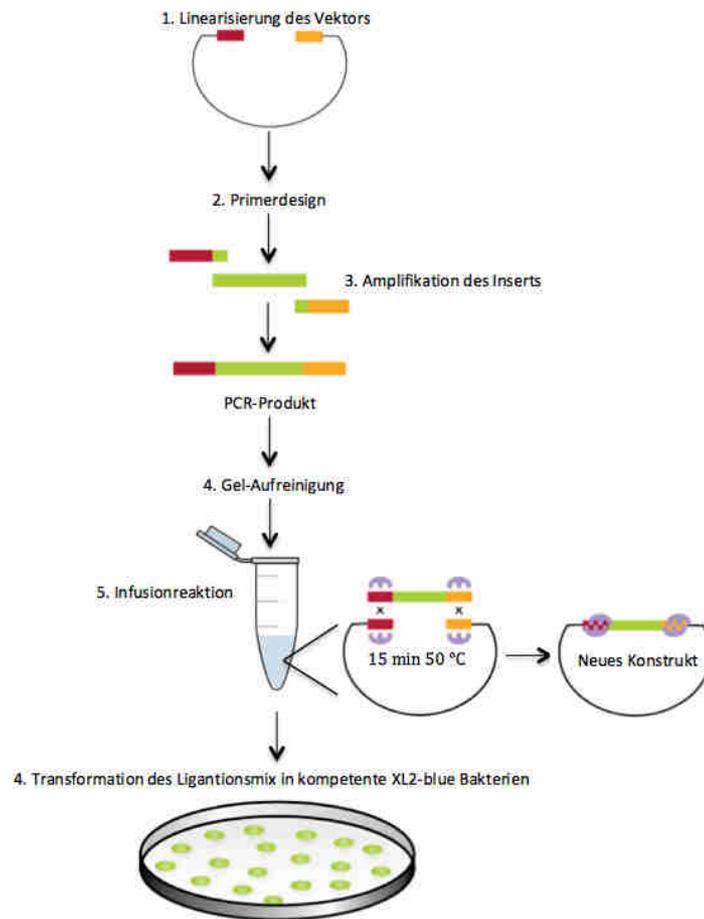


Abbildung 12: Schematischer Ablauf einer In-Fusion® Klonierung. Diese Art der Klonierung beruht nicht auf passenden Restriktionschnittstellen auf der Vektor- bzw. Insert-DNA, sondern auf der Amplifikation der Insert-Fragmente mit selbst entworfenen Primern, welche im Anschluss in einen linearisierten Vektor eingefügt werden. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

Im ersten Schritt der In-Fusion® Klonierung wurde der Vektor enzymatisch linearisiert. Für diesen Schritt wurde das Protokoll eines Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen verwendet. Der einzige Unterschied bestand darin, dass der Vektor im Anschluss nicht dephosphoryliert werden musste. Gleichzeitig wurde mit dem Insert-Vektor und den vorher entworfenen Primern eine PCR zur Vervielfältigung des Insert-Fragments durchgeführt. Beide Ansätze, PCR- und Restriktionsansatz wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die passenden Banden durch eine Gelaufreinigung vom Gel befreit. Für die In-Fusion® Ligation wurde das vom Hersteller mitgelieferte Enzym verwendet. Die eingesetzten Mengen an Insert- und Vektor-DNA wurden an den vom Hersteller angegebenen Empfehlungen berechnet.

Ansatz für In-Fusion® Ligation

10-200 ng PCR-Fragment

50-200 ng linearisierter Vektor

2 µL In-Fusion® Enzym

x µL HPLC- H₂O

10 µL Ansatzvolumen

Die In-Fusion® Ligation erfolgte für 15 min bei 50 °C in einem Heizblock. Der Ansatz wurde im Anschluss auf Eis gelagert und später transformiert.

4.2.9 PCR

Die für die In-Fusion® Klonierung verwendeten Inserts wurden mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können DNA-Fragmente gezielt vervielfältigt werden. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang bei 95 °C aufgespalten, um so das Anlagern von kurzen synthetischen Oligonukleotiden (Primer) zu ermöglichen. Im Anschluss an die Denaturierung des DNA-Strangs folgte das Annealing, bei dem sich die Primer an den offenen Strang anlagern. Die Temperatur musste so gewählt werden, um eine Hybridisierung mit dem DNA-Strang zu ermöglichen. Gleichzeitig muss diese Bindung auch spezifisch sein. Für das erstellte PCR-Programm wurden deswegen zwei verschiedene Annealing-Temperaturen gewählt. Zuerst wurde die Schmelztemperatur des genspezifischen Teils des Primers gewählt, um eine möglichst spezifische Bindung zu gewährleisten. Im Anschluss daran erfolgten die Zyklen mit der Schmelztemperatur des gesamten Primers. Für die Elongationsschritte wurde eine Temperatur von 70 °C gewählt. Bei dieser Temperatur hat die KOD-Polymerase ihr Aktivitätsoptimum und ist in der Lage einen neuen DNA-Strang, komplementär zum Matrizen-Strang, zu bilden. In einem finalen Elongationsschritt wurden nach dem letzten Zyklus bei 70 °C alle verbleibenden Einzelstränge aufgefüllt. Im Anschluss an die PCR wurde die Probe bei 4 °C gelagert.

Ansatz für PCR

- 32 μL HPLC- H_2O
 - 5 μL dNTPs
 - 5 μL KOD-Buffer
 - 2 μL MgSO_4 (1,5 mM)
 - 1 μL KOD-Poymerase
 - 2 μL forward primer (10 mM)
 - 2 μL reverse primer (10 mM)
 - 1 μL DNA (1 ng/ μL)
-
- 50 μL Ansatzvolumen

PCR-Programm

95 °C	120 s			
95 °C	20 s	}	10x	
x °C	15 s			
70 °C	15 s			
95 °C	20 s	}	20x	
y °C	15 s			
70 °C	15 s			
70 °C	10 s			
4 °C	Kühlung			

x = Annealing Temp. der genspezifischen Primersequenz

y = Annealing Temp. des ganzen Primers

4.2.10 Aufreinigen von DNA

DNA-Gelextraktion

Um die DNA, die mittels Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt wurde, wieder aus dem Gel zu befreien, wurden die entsprechende Banden mit einem Skalpell, das vorher mit Ethanol sterilisiert wurde, ausgeschnitten. Diese wurden im Anschluss mit dem NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kit der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt. Bei der Durchführung wurde das mitgelieferte Herstellerprotokoll befolgt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde im Anschluss mit dem NanoDrop gemessen.

Miniprep

Die Plasmidpräparation ist ein Verfahren, um Plasmid-DNA aus Bakterien zu extrahieren und aufzureinigen. Dafür wurden mehrere Kolonien der transformierten Bakterien gepickt und in 5 mL antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 220 rpm in einem Schüttelinkubator kultiviert. Bei der Isolierung der rekombinanten DNA wurde das mitgelieferte Herstellerprotokoll befolgt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde im Anschluss mit dem NanoDrop gemessen.

Ethanolpräzipitation

Die Ethanolpräzipitation wurde verwendet, um die DNA aufzureinigen und zusätzlich eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Dafür wurden mehrere Minipreps vereinigt und mit dem dreifachen Volumen an 100 %-igem Ethanol gemischt. Zu dem neu entstandenen Gesamtvolumen wurde $\frac{1}{10}$ einer 3 molaren Natriumacetatlösung gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei -20 °C wurde die Lösung für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 150 µL 70 %-igem Ethanol gewaschen, woraufhin wieder für 10 min unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut entfernt und das DNA-Pellet in 50 µL TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentration der DNA wurde am NanoDrop bestimmt.

4.2.11 Analyse von Nukleinsäuren

Quantitative Nukleinsäurebestimmung

Eine quantitative Analyse der gewonnenen DNA wurde mit Hilfe der UV-VIS-Spektroskopie am NanoDrop 2000 durchgeführt. In ihrem Grundzustand besteht DNA aus zwei helikal gewundenen Desoxyribose-Strängen, deren komplementäre Basen durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft sind. Aus dieser Struktur ergeben sich die UV-Absorptionseigenschaften mit einem Peakmaximum bei 260 nm. Die Konzentration der DNA wurde aus der gemessenen Absorption bei 260 nm nach dem Lambert Beer'schen Gesetz bestimmt, nach welchem eine Absorption von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/µL entspricht.

Qualitative Nukleinsäurebestimmung

Die häufigsten Verunreinigungen in DNA-Lösungen werden durch Proteine verursacht. Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Durch Bestimmung des Quotienten der

Absorption bei 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit von Nukleinsäuren bestimmt werden. Wenn dieser zwischen 1,8 und 2 liegt beträgt die Reinheit 70-95 %.

4.2.12 SDS-Page

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese handelt es sich um eine Aufreinigungsmethode, bei der Proteine in einem Gel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Es wurden dafür Gele verwendet, die aus quervernetzten Acrylamidmolekülen ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Durch dieses Netzwerk werden große Proteine, nach Anlegen einer Spannung, stärker zurückgehalten als kleinere und wandern deswegen langsamer durch das Gel. Auf dem Gel entstehen so für unterschiedlich große Moleküle deutlich voneinander abzugrenzende Banden. Um die Proteine mit einer gleichermaßen negativen Ladung zu versehen wurden diese vor der Auftrennung mit SDS versehen.

Für die Probenvorbereitung wurden 10 µL von verschiedenen Zellüberständen unter der Sicherheitswerkbank in Mikroreaktionsgefäße überführt und mit 10 µL 2x SDS *Loading Dye* versetzt. Zusätzlich wurden unter dem Abzug 2 µL DTT *Reducing Agent* zu den Proben pipettiert, um diese im Anschluss für 10 min bei 70 °C im Hitzeblock zu denaturieren. In die Gelkammer wurden 12 %-ige Bis-Tris Fertiggele eingebaut. Der Gelzwischenraum wurde mit MES-Puffer und 500 µL Antioxidans befüllt. Um die Gele zu beladen, wurden die Käbme entfernt und 5 µL eines Proteinstandards in die erste Tasche pipettiert. Die restlichen Taschen wurden mit je 22 µL Probe befüllt. Für die Proteinauftrennung wurde für 30 min eine Spannung von 200 V angelegt.

4.2.13 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht eine Identifizierung eines gesuchten Proteins innerhalb eines Proteingemisches. Dafür werden die Proteine nach der Auftrennung in einem Gel von diesem auf eine Membran übertragen, um auf dieser nachgewiesen zu werden. Dieser Nachweis gelingt in der Regel durch Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an antigene Epitope, des auf der Trägermembran fixierten Proteins bindet. Aufgrund dieser Art der Detektion spricht man beim Western Blot auch häufig von einem Immunoblot. Noch während die Proteinproben durch das SDS-Gel laufen, wurden die für den Aufbau der Blotting-Kammer nötigen Schwämme, Filterpapiere und die NC-Membran in Blotting Puffer eingelegt. Die Membran, auf die das Protein während des Blots übertragen wurde, heißt PVDF-Membran. Diese wurde für etwa eine halbe Minute unter Schwenken in Methanol aktiviert und im

Anschluss in Blotting Puffer gelagert. Nachdem die Gelelektrophorese gestoppt wurde, wurde auch das Gel, um den Laufpuffer zu entfernen für etwa 1 min in Blotting Puffer gelegt. Der Aufbau der Kammer wurde wie in der Skizze dargestellt vorgenommen.



Abbildung 13: Schematischer Aufbau einer Blottingkammer für Western Blots. Die Proteine werden in einem senkrechten Aufbau vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran übertragen. Dabei wandern die Proteine im elektrischen Feld in der Richtung der Anode und bleiben durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Oberfläche der Membran hängen. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

Die Blotting-Kammer wurde in eine SDS-Kammer eingebaut und im Inneren mit Blotting Puffer befüllt. Da der Transfer der Proteine durch Luftblasen beeinträchtigt werden kann, wurden diese vorsichtig herausgeklopft. Um ein Überhitzen der Kammer während des Blots zu vermeiden, wurde die äußere Kammer zu einem Drittel mit VE-Wasser gefüllt. Der Blot erfolgte für 1,5 h bei 30 V sowie 300 mA. Um den unspezifischen Hintergrund zu blockieren, wurde die PVDF-Membran nach dem Blot, mit der Blottingseite nach innen, in ein 50 mL Falcon-Tube mit etwa 10 mL 5 %-iger Milchpulverlösung in den Kühlraum auf einen Roller gelegt. Blockiert wurde über Nacht. Der Nachweis des gesuchten Proteins erfolgte am nächsten Tag mittels Immundetektion. Dafür wurde die Membran zuerst mit einem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet. Es wurde ein anti-GFP-Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung verwendet. Dieser wurde zusammen mit 5 %-iger Milchpulverlösung und 2,5 % Tween 20 für 1,5 h auf einem Roller inkubiert. Tween 20 verhindert als oberflächenaktives Detergenz unspezifische Bindungen von Antikörpern. Nach der Inkubation wurde die Membran, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, 3 Mal für je etwa 2 min mit 1xTBS-Puffer auf einem Roller gewaschen. Danach wurde für 1 h mit einem Sekundärantikörper und 2,5 % Tween 20 in Milchpulverlösung inkubiert. Es wurde ein anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 verwendet, da dieser spezifisch an

die Fc-Region des Primärantikörpers bindet. Nach dieser zweiten Inkubation und etwa 6 Waschschritten erfolgte die endgültige Detektion. Dafür wurde die Membran aus dem Falcon-Tube entnommen und in eine Schale gelegt, um dort für etwa 2 min mit den Detektionsreagenzien 1 und 2 zu reagieren. Die Membran wurde im Anschluss möglichst luftblasenfrei in Frischhaltefolie verpackt und in einer Entwicklerkassette, welche zuvor kurz in hellem Licht aktiviert wurde, fixiert. Dargestellt wurde der Blot auf einem Chemilumineszenzfilm, welcher unter keinen Umständen belichtet werden durfte. Aus diesem Grund wurde beim Entwickeln nur unter Rotlicht gearbeitet. Dafür wurde der Film für etwa 15-25 s auf die in der Kassette fixierte Membran gelegt und diese fest verschlossen. Nach verstrichener Zeit wurde der Film aus der Kassette genommen und in den Entwickler gelegt, in dem er mehrere Bäder mit unterschiedlichen Lösungen durchläuft, durch die der Blot entwickelt, fixiert und im Anschluss abgewaschen wird.

4.2.14 Aminolink

Um eine Möglichkeit zu schaffen, die Sensorproteine aus den geernteten Überständen zu isolieren, wurden Sepharose-Beads mit Antikörpern gekoppelt, die eine hohe Affinität für den Sensor besitzt. Es wurde ein anti-GFP-Antikörper verwendet, welcher mit dem AminoLink® Plus Immobilization Kit an die Oberfläche der Beads gebracht wurden. Dafür wurde das vom Hersteller bereitgestellte Protokoll verwendet.

4.2.15 Aufreinigung der Sensorproteine mittels Aminolink-Sepharose-Beads

Die gekoppelten Beads wurden für die Aufreinigung der Sensorproteine verwendet. Dafür wurden etwa 30 μL der Bead in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und 2 Mal mit 500 μL PBS^{+/+} gewaschen. Es wurden 200 μL des jeweiligen Überstands zu den Beads gegeben und für 30 min auf einem Roller mit diesen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads für etwa 10 s bei 2000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde für eine spätere Kontrolle aufbewahrt. Im Anschluss wurde die Matrix mit jeweils 500 μL 0,5 %igem Triton X-100 in PBS^{+/+} gewaschen. Es wurde 2 Mal kurz durch leichtes Schwenken des Reaktionsgefäßes und 2 Mal lange für etwa 3 min auf einem Roller gewaschen. Zum Schluss erfolgte noch ein letzter Waschschriff, für den nur PBS^{+/+} verwendet wurde. Der Überstand wurde nach jedem Schritt verworfen. Um die Proteine von der Matrix zu eluieren, wurde 20 μL 2x SDS-Probenpuffer und 2 μL DTT zugegeben und die Proben für 10 min bei 70 °C erhitzt. Um zu

vermeiden, dass Beads mit auf das Gel gelangten, wurde der Überstand vor dem Auftragen auf das SDS-Gel vorsichtig abgenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse von ATPFS1-transfizierten HEK-Zellen

Um die Eigenschaften der ATP-Sensoren genauer untersuchen zu können, wurden mit ATPFS1 stabil transfizierten HEK-Zellen in Kultur genommen. Die Zellen waren bereits mit einem der drei Sensorkonstrukte PS3, Bs und RRKK, sowie mit einem pcDNA3.1-zeo-Vektor kotransfiziert. Letzterer enthält eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin, so dass in Anwesenheit von Zeocin transfizierte Zellen bei jeder Passage positiv selektiert wurden. Die ATPFS1-Konstrukte enthielten den ProteinG-Tag und die Zellen sollten daher lösliches Sensorprotein in den Überstand sezernieren. Um die Effizienz der Expression von ATPFS1 qualitativ zu beurteilen, wurden die Zellen unter dem Evos-Mikroskop auf ihre Grünfluoreszenz untersucht.

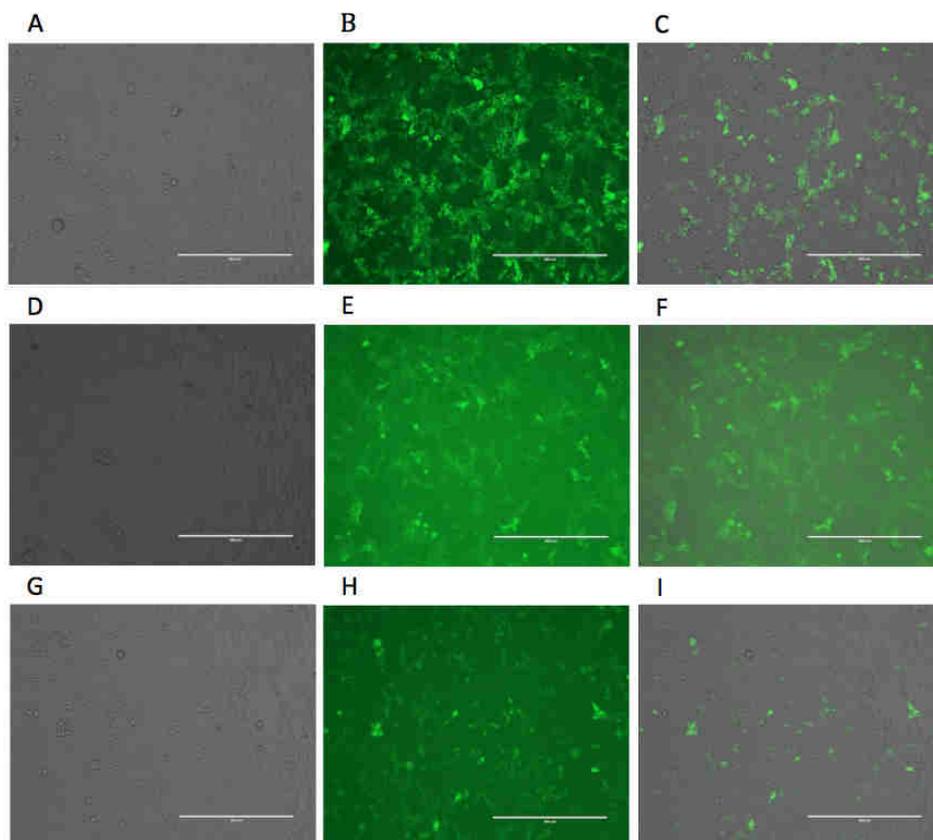


Abbildung 14: Mikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz der HEK-ATPFS1-Zellen. Positiv transfizierte Zellen können aufgrund ihrer Grünfluoreszenz unter dem Evos-Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Die unterschiedlichen ATPFS1-Sensorkonstrukte wurden zusammen mit einem pcDNA3.1-zeo-Vektor in HEK-Zellen eingebracht. In den einzelnen Spalten sind von links nach rechts, die HEK-Zellen ohne Grünanregung (A,D,G), mit Grünanregung (B,E,H) und ganz rechts im Overlay (C,F,I) zu sehen. In den Reihen von oben nach unten sind die verschiedenen, in die Zellen eingebrachten Sensorkonstrukte, RRKK (A-C), Bs (D-F) und PS3 (G-I) dargestellt. Die Grünfluoreszenz im Overlay lässt auf eine erfolgreiche Transfektion schließen.

Anhand der in Abbildung 13 gezeigten Grünfluoreszenz der transfizierten HEK-Zellen lässt sich auf einen erfolgreichen Transfektionsverlauf schließen. Um eine quantitative Aussage im Bezug auf die Sensor-exprimierenden Zellen machen zu können, wurde zusätzlich eine FACS-Analyse der Zellen durchgeführt.

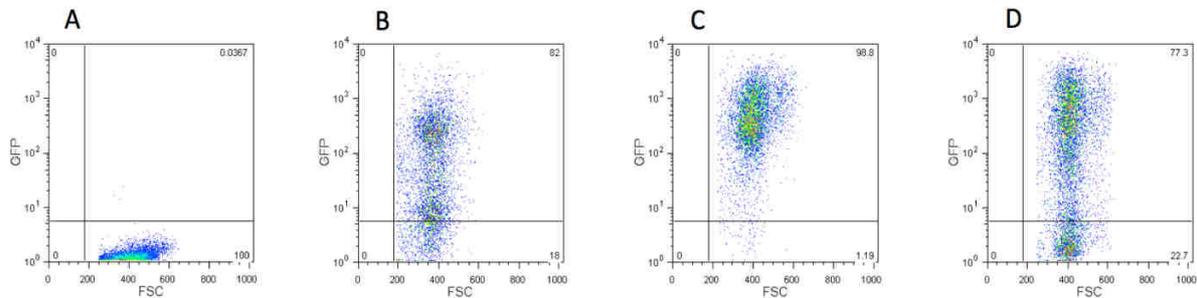


Abbildung 15: FACS-Analyse der mit ATPFS1-Sensoren transfizierten HEK-Zellen. Als Kontrolle für die Messung wurden untransfizierte HEK-Zellen verwendet (A), da sie im Gegensatz zu den Sensor-transfizierten Zellen über keine eigene Grünfluoreszenz verfügen. Durch die Eigenfluoreszenz der transfizierten Zellen mussten diese vor der Messung nicht angefärbt werden. Bei der Messung wurde die Grünfluoreszenz (GFP) gegen den *Forward Scatter* (FSC) gemessen. Es wurden nacheinander PS3- (B), Bs- (C) sowie RRKK-transfizierte HEK-Zellen (D) gemessen. Sowohl PS3- als auch RRKK-transfizierte Zellen zeigen eine Population von etwa 80 % GFP-positiv Zellen. Im Vergleich dazu sind nahezu 100 % der Bs-transfizierten Zellen GFP-positiv.

Durch die FACS-Analyse konnte eine quantitative Aussage über die Transfektionseffizienz gemacht werden. RRKK bzw. PS3-transfizierte HEK-Zellen waren zu 77 bzw. 82 % GFP-positiv. Bs-transfizierte Zellen zeigen mit 98 % Grünfluoreszenz eine nahezu vollständige Transfektionseffizienz.

Um die Proteinproduktion zu steigern, wurden untransfizierte und transfizierte Zellen zusätzlich zur Zeocin-Selektion, mittels FACS-Zell-Sorting voneinander getrennt. Sortiert wurde, wie in Abbildung 15 zu sehen ist, anhand der hohen Grünfluoreszenz der positiv-transfizierten Zellen.

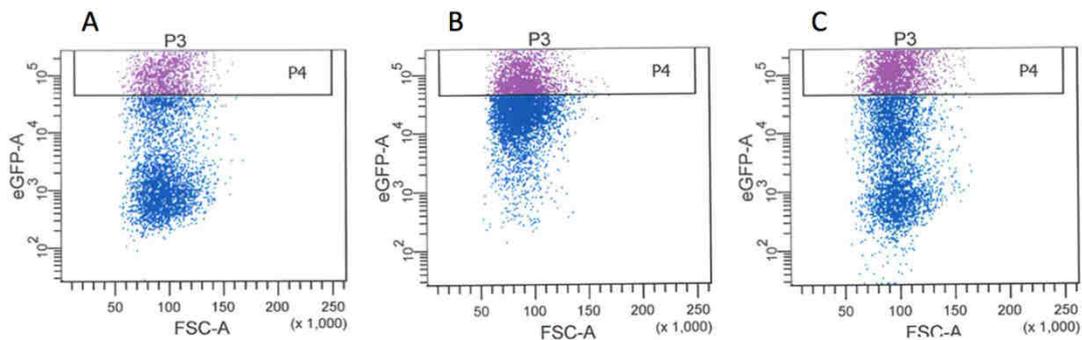


Abbildung 16: FACS-Sorting-Kriterium. Nur Zellen im oberen Grünfluoreszenz-Bereich (lila) wurden durch die Durchflusszytometrie erfasst. Alle anderen Zellen (blau) wurden verworfen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden positiv sortierten Zellen für etwa eine Woche in gentamicinhaltigem Medium kultiviert.

Um den Erfolg des Zell-Sortings bewerten zu können, wurden die Zellen erneut unter dem Mikroskop auf ihre Grünfluoreszenz untersucht. Um eine quantitative Aussage über eine eventuelle Steigerung der Proteinexpression machen zu können, wurde erneut eine FACS-Analyse durchgeführt.

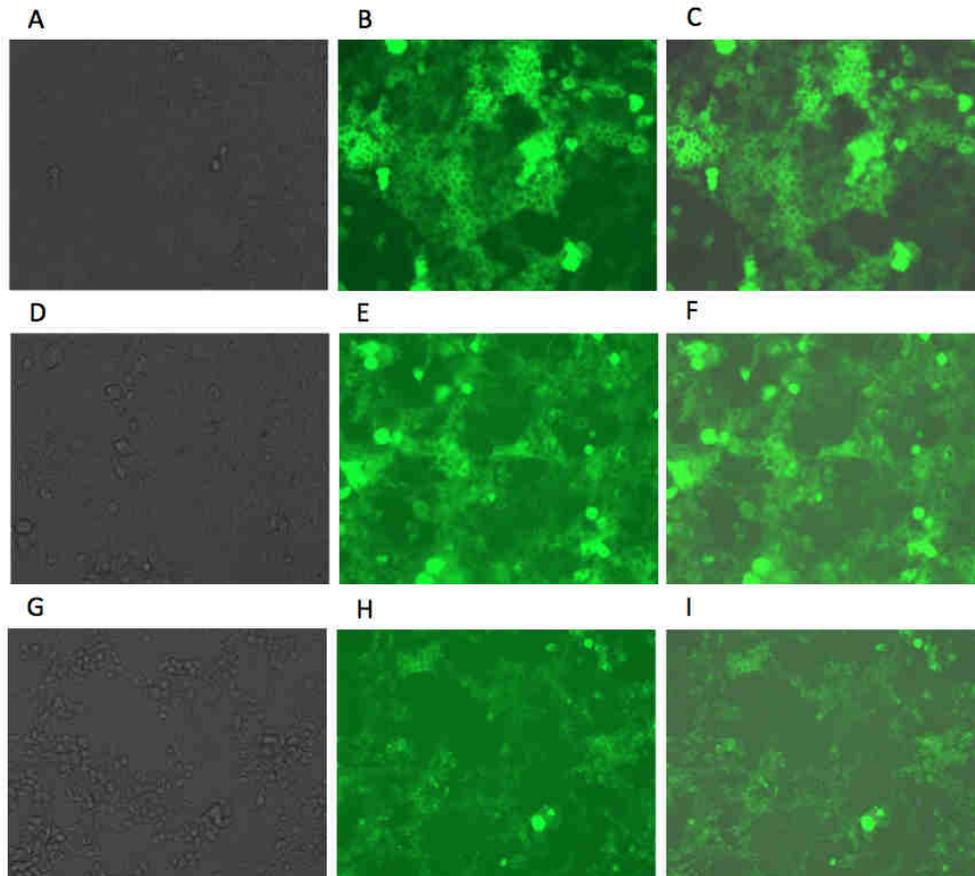


Abbildung 17: Mikroskopische Kontrolle der sensorexprimierenden HEK-Zellen nach dem Sorting. Gezeigt ist von links nach rechts wiederum das Durchlichtbild (A,D,G), die Anregung der Zellen durch Grünfluoreszenz (B,E,H) und der Overlay (C,F,I). In den Reihen von oben nach unten sind RRKK- (A-C), Bs- (D-F) und PS3-transfizierte HEK-Zellen (G-I) dargestellt. Durch die deutlich stärkere Grünfluoreszenz im Overlay im Vergleich zu der in Abbildung 13, konnte eine deutliche Steigerung der Sensor produzierenden HEK-Zellen festgestellt werden.

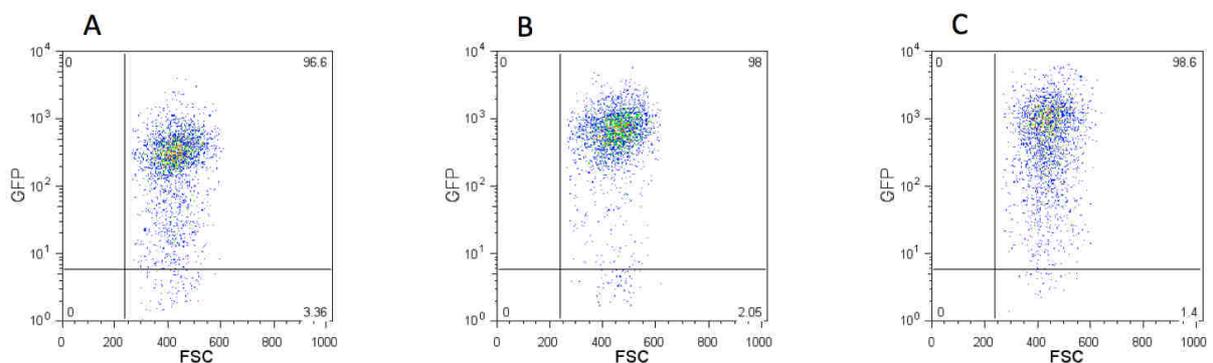


Abbildung 18: FACS-Analyse der mit ATPFS1-transfizierten HEK-Zellen nach dem Sorting. Es wurde wiederum die Grünfluoreszenz (GFP) gegen den *Forward Scatter* (FSC) aufgetragen. Nach dem Sorting zeigen alle Zellen eine gleichmäßige Population mit nahezu 100 % grün fluoreszierenden Zellen, was für den Erfolg des Sortings spricht. Zu sehen sind PS3-transfizierte Zellen mit etwa 97 % Grünfluoreszenz (A), sowie Bs- (B) und RRKK-transfizierte Zellen (C), die beide zu etwa 98% GFP-positiv sind.

Sowohl die mikroskopische Kontrolle in Abbildung 17, als auch die FACS-Analyse der gesorteten Zellen in Abbildung 18 zeigen eine deutliche Verbesserung der Sensorexpression anhand der gesteigerten Grünfluoreszenz der Zellen. In der FACS-Analyse ist zu erkennen, dass nach dem Sorting fast 100 % der Zellen das Sensorprotein exprimieren.

Ziel der Arbeit war es, die Sensorproteine auf unterschiedliche Arten an die Oberfläche von Zellen zu koppeln. Um eine Aussage über die Bindungskapazität von ATPFS1-Sensoren an der Oberfläche von DC27.10 NOD-Zellen zu machen, wurden diese, nach vorheriger Kopplung mit einem Antikörper in unterschiedlichen Mengen zu den Zellen pipettiert und mit diesen inkubiert. Zusätzlich sollte eine Aussage über eine mögliche Sättigung der Zellen gemacht werden. Der Versuch wurde mit dem PS3-Sensorkonstrukt durchgeführt. Die Effizienz der Kopplung wurde im Anschluss an die Inkubation mittels Durchflusszytometrie gemessen.

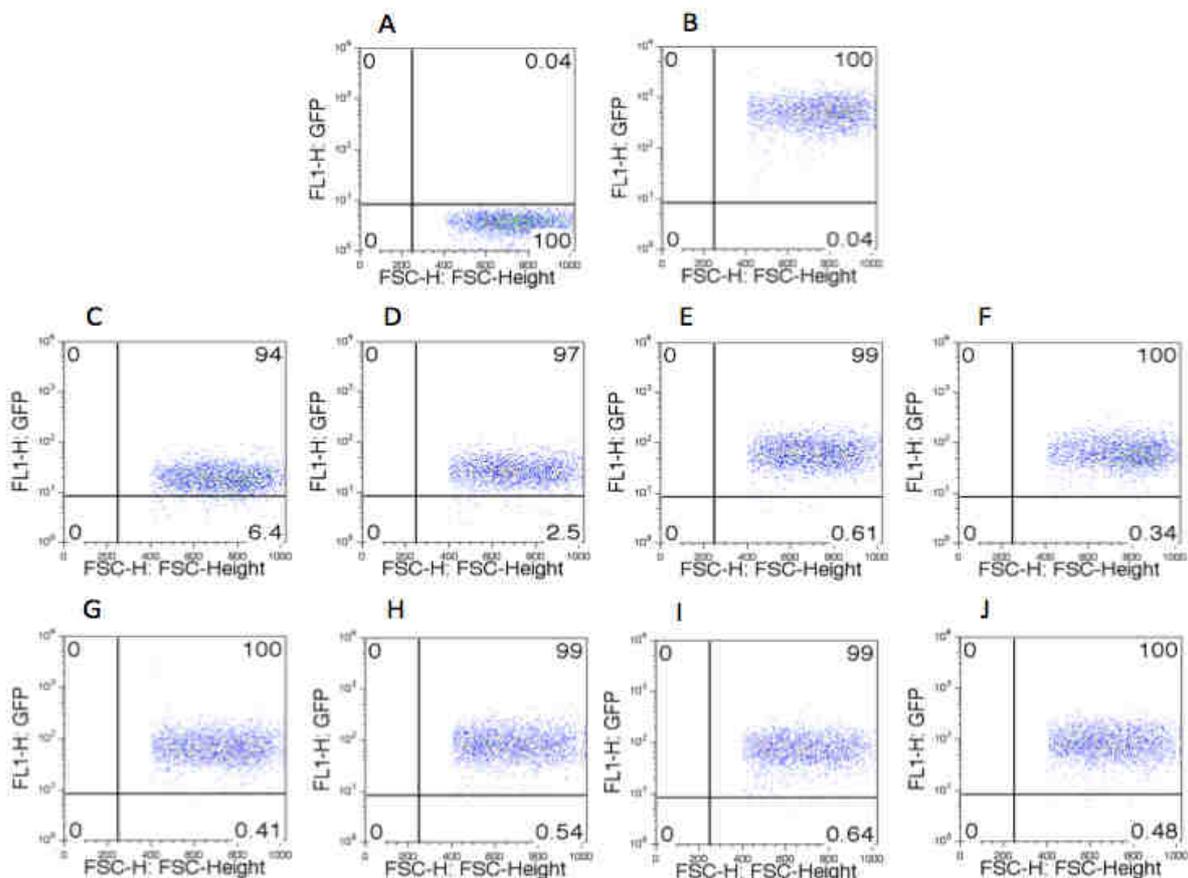


Abbildung 19: Sensortitration zur Messung der Bindungskapazität von DC27.10 NOD-Zellen. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte DC27.10 NOD verwendet (A). Für die Positivkontrolle wurden Zellen mit einem FITC-markierten Goat-anti-Rat-Antikörper gekoppelt (B). Für die Kopplung wurde der Sensor PS3 verwendet. Da dieser nicht direkt an die Zellen bindet, wurden die Zellen zuerst mit s-14-Rabbit-Fc inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden unterschiedliche Volumina des Sensors auf die Zellen gegeben. Es wurden Volumina von 25 μ L (C), 50 μ L (D) und danach in 50 μ L-Sprünge bis 350 μ L (E-J) des PS3-Überstands auf die Zellen gegeben.

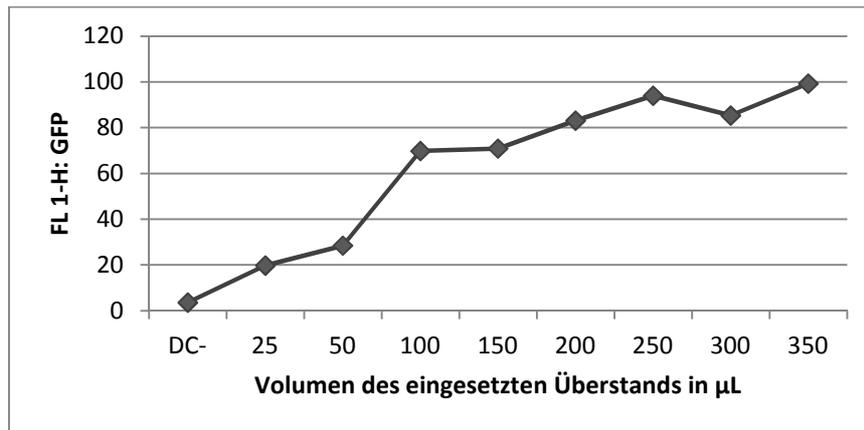


Abbildung 20: Graphische Auswertung der FACS-Analyse in Abbildung 19. Um einen genaueren Verlauf der Bindungskapazität darzustellen, wurde das Überstandsvolumen gegen die Grünfluoreszenz der an die Zellen gebundenen Sensoren aufgetragen. Mit zunehmendem Sensorvolumen ist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzfähigkeit zu erkennen.

In Abbildung 19 ist sehr deutlich zu erkennen, dass die Zunahme des Sensorvolumens mit einer Zunahme der Grünfluoreszenz der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen korreliert. Da ab einem Volumen von etwa 200 µL nicht mehr deutlich zu erkennen ist, ob der Anstieg stagniert, wurde für eine genauere Analyse eine graphische Auswertung der FACS-Analyse angefertigt. Diese Auswertung in Abbildung 20 bestätigt einen Anstieg der Grünfluoreszenz abhängig von der Menge, der an die Zelloberfläche gekoppelten Sensoren. In der graphischen Auswertung ist bei einem Volumen von 250 µL ein leichtes Abflachen der Kurve zu beobachten.

5.2 Klonierung von ATPFS2-Konstrukten in pMXs-IP

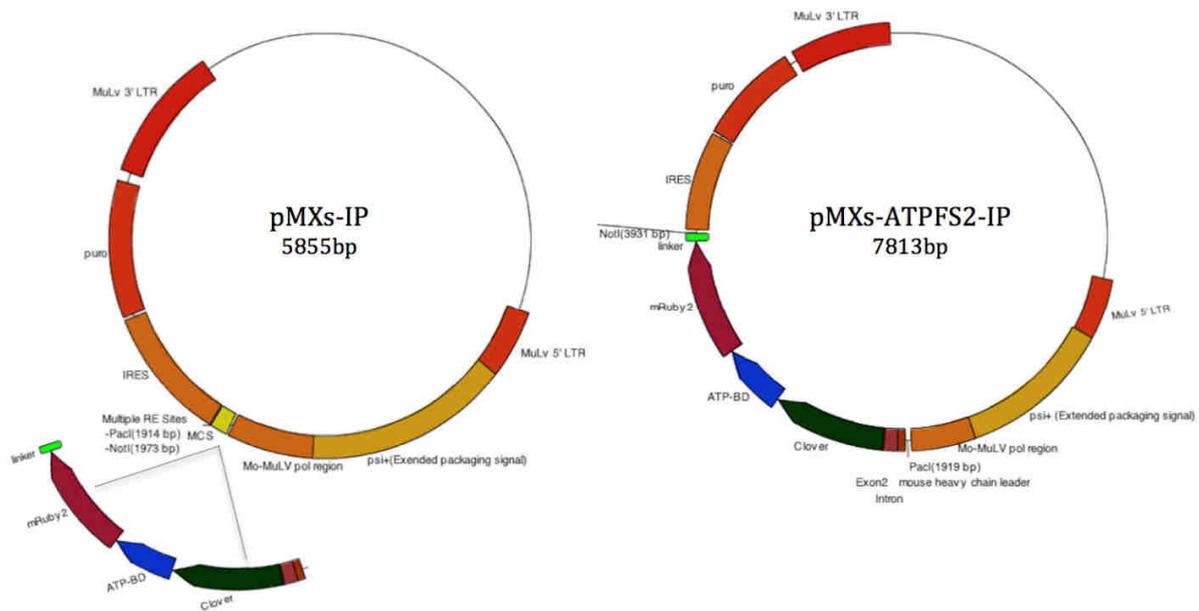


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Klonierung von pMXs-ATPFS2-IP. Der Vektor pMXs-IP wurde ebenso wie die ATPFS2-Sensorkonstrukte durch PacI und NotI geschnitten. Diese beiden Fragmente wurden nach einer Aufreinigung in einem 1 %-igen Agarosegel durch das Enzym Ligase zusammengefügt. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

Um auch die ATPFS2-Sensoren für die Produktion in zelluläre Systeme einzubringen, wurde ein retrovirales Expressionssystem gewählt. Dieses hat zum einen den Vorteil, dass die für die Sensorkonstrukte kodierende DNA in das Genom der Zelle integriert wird und zum anderen, dass damit auch einige Zelllinien transduziert werden können, die sonst schwer transfizierbar sind³⁶, wie die in dieser Arbeit verwendete Maus Myelom-Zelllinie sp2/0.

Dazu wurden die Sensoren in den retroviralen pMXs-IP-Vektor kloniert. Wegen der verfügbaren Restriktionsschnittstellen wurden in diesen Vektor die Sensorkonstrukte mit der N-terminalen Leadersequenz, nicht jedoch mit dem C-terminalen Protein G-Tag kloniert. Die erwarteten retroviralen Konstrukte würden also für sezernierte Proteine ohne Affinitäts-Tag kodieren.

Für diese Klonierung wurden sowohl Vektor, als auch die verschiedenen Inserts mit den Restriktionsenzymen NotI und PacI geschnitten. Nach der Dephosphorylierung des Vektors wurden sowohl der Vektor, als auch die Inserts auf ein Agarosegel aufgetragen, um die unterschiedlichen Fragmente, wie in Abbildung 22 dargestellt, entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Die gesuchten DNA-Banden wurden aus dem Gel geschnitten.

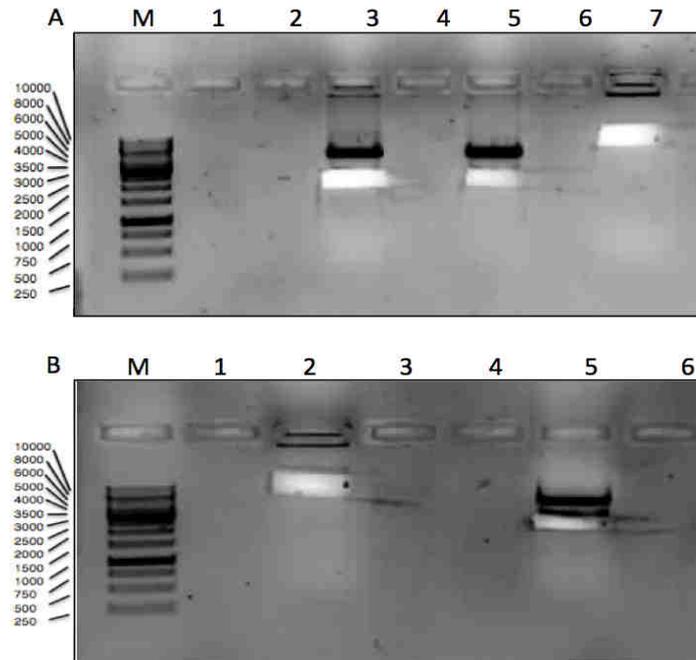


Abbildung 22: Elektrophoretische Auftrennung des geschnittenen pMXs-IP-Vektors und der ATPFS2-Inserts. Nach Anregung durch UV-Licht sind die Banden der einzelnen DNA-Fragmente im Gel sichtbar. Der eingesetzte Marker GeneRuler 1kB ist als Bande (M) auf den Gelen (A,B) zu sehen. Der geschnittene Vektor ist als Bande (7, Gel A; 2, Gel B) auf erwarteter Höhe zu erkennen. Die geschnittenen Inserts, RRKK (3, A), Bs (5, A) und PS3 (5, B) sind auf der Höhe von etwa 2200 bp zu sehen. Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten.

Nach dem Herausschneiden wurde die DNA mittels Gelextraktions-Aufreinigung aus dem Gel befreit, um Vektor und Insert im Anschluss zu ligieren. So wurden die neuen rekombinanten Vektoren pMXs-ATPFS2_Bs-IP, pMXs-ATPFS2_PS3-IP und pMXs-ATPFS2_RRKK-IP hergestellt, welche im Anschluss durch Transformation in XL2-blue Bakterien eingebracht wurden. Die DNA wurde mittels Miniprep isoliert und zur Sequenzierung zu *Seqlab* nach Göttingen geschickt. Die Sequenzierung ergab, dass die Klonierung nur bei den Sensorstrukturen Bs und PS3 erfolgreich war. Die erwartete Sequenz von pMSs-ATPFS2_RRKK-IP konnte auch nach mehrfacher Klonierung nicht hergestellt werden und somit wurde in allen weiteren Versuchen nur mit pMXs-ATPFS2_Bs-IP und pMXs-ATPFS2_PS3-IP weiter gearbeitet. Mit den beiden Konstrukten wurden eine Retransformation und im Anschluss mehrere Plasmidpräparationen durchgeführt. Diese Minipreps wurden, um eine höhere Reinheit und DNA-Konzentration zu erhalten, mittels Ethanolpräzipitation aufgereinigt und anschließend bei -20 °C gelagert.

5.3 In-Fusion® Klonierungen

Um die Sensorproteine an die Zelloberfläche zu bringen, wurden diese mit verschiedenen Tags versehen, die entweder direkt oder indirekt in der Lage sind an die Membran zu binden. Dafür wurde sowohl ein ProteinG-Tag, als auch verschiedene Nanobody-Tags verwendet, die entweder am C- oder N-Terminus des Sensorproteins angebracht wurden.

5.3.1 In-Fusion® Klonierung eines ProteinG-Tags

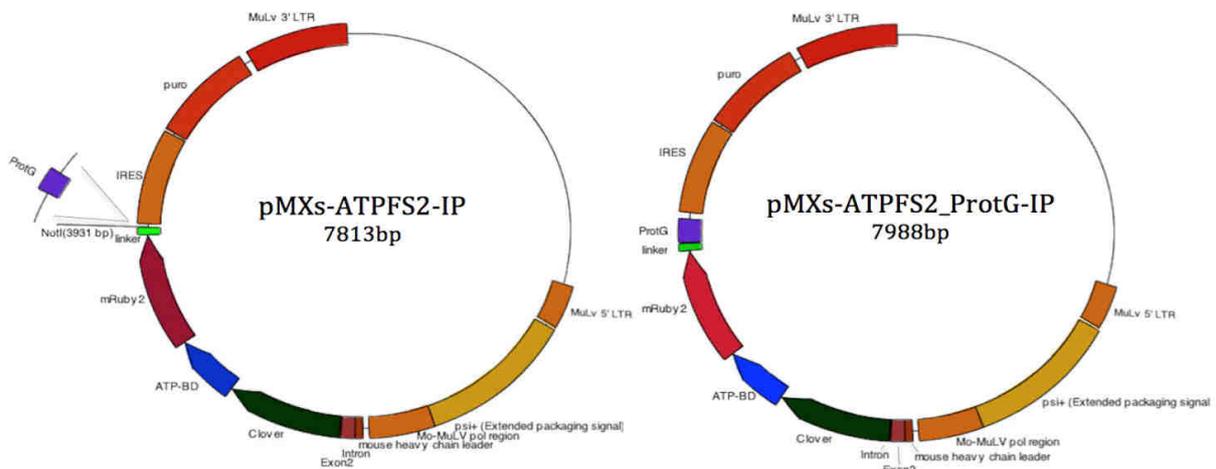


Abbildung 23: Schematische Darstellung der In-Fusion® Klonierung von pMXs-ATPFS2-ProtG-IP. Der Vektor wurde hinter der Linker-Sequenz an der Restriktionsstelle NotI enzymatisch geschnitten. Die Insert-Sequenz wurde mit den selbst entworfenen Primern INF_ProtG-F und INF_ProtG-R mittels PCR amplifiziert. Vektor- und Insert-Fragmente wurden nach der Aufreinigung in einem 1 %-igen Agarosegels miteinander ligiert. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

ProteinG ist ein bakterielles Zellwandprotein aus der Gattung *Streptococcus*, das in der Lage ist, an Immunglobulin G zu binden³⁷. Die Bindung von ProteinG an IgG findet am C-Terminus des Moleküls statt, wo es eine hohe Affinität für dessen Fc-Region besitzt³⁸. Durch diese Eigenschaft sollte es später möglich gemacht werden, die Sensoren an die mit Antikörpern gecoatete Oberfläche von Zellen zu bringen. Für das Einfügen eines ProteinG-Tags am C-Terminus des Sensorproteins wurden die pMXs-ATPFS2-IP-Vektoren von PS3 und Bs enzymatisch mit NotI geschnitten. Gleichzeitig wurde mit dem ProteinG-Insert eine PCR durchgeführt, um die Sequenz des Inserts zu amplifizieren. Die PCR wurde mit den entworfenen Primern INF_ProtG-F und INF_ProtG-R durchgeführt. Da für die In-Fusion® Klonierung keine Dephosphorylierung des Vektors nötig war, wurden sowohl Vektor als auch Insert-Fragmente sofort nach dem Verdau bzw. der PCR auf ein Agarosegel aufgetragen, um die gesuchten Banden herauszuschneiden.

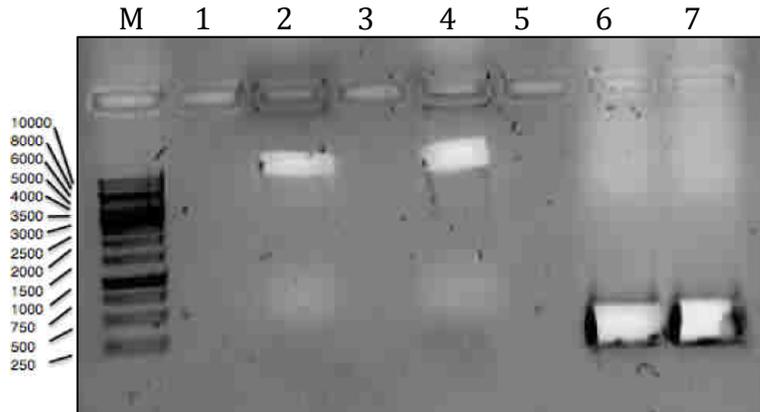


Abbildung 24: Elektrophoretische Auftrennung der pMXs-ATPFS2-IP-Vektoren PS3 und Bs, sowie des ProteinG-Inserts. Die Banden wurden auf einer UV-Platte sichtbar gemacht. In Bande (M) ist der eingesetzte Marker, GeneRuler 1kB, zu sehen. Die geschnittenen Vektoren pMXs-ATPFS2_Bs-IP (2) und pMXs-ATPFS2_PS3-IP (3) sind auf erwarteter Höhe im Gel zu erkennen. Das ProteinG-Insert wurde aufgrund des größeren PCR-Ansatzvolumen in zwei Geltaschen aufgetragen (6 & 7).

Nach dem Herausschneiden der richtigen Banden und einer Gelaufreinigung wurden die pMXs-ATPFS2-IP-Vektoren von PS3 und Bs mit dem ProteinG-Insert zu pMXs-ATPFS2_PS3_ProtG-IP und pMXs-ATPFS2_Bs_ProtG-IP ligiert. Nach der Transformation wurde mit diesen beiden Konstrukten, zur Aufkonzentrierung der DNA eine Ethanol-fällung durchgeführt. Um die Expression der Konstrukte zu überprüfen, wurde die so aufbereitete DNA, wie in Abbildung 25 zu sehen ist, durch Transformation in HEK-Zellen eingebracht. Gleichzeitig wurde das PS3-Konstrukt für die Produktion des Sensors in die Myelomzelllinie sp2/0 eingebracht. Es sollte überprüft werden, ob diese Zelllinie aus professionell Antikörper-sezernierenden Zellen nicht besser für die Sensorproduktion geeignet ist als HEK-Zellen. Um retrovirale Partikel herzustellen, wurde der rekombinante retrovirale Vektor pMXs-ATPFS2_PS3_ProtG-IP zusätzlich in Platinum E Zellen eingebracht und der retrovirale Überstand nach 24 h geerntet, um eine Transduktion an sp2/0-Zellen durchzuführen. Da der pMXs-IP-Vektor über eine Puromycin-Resistenz verfügt, fand anhand dieser eine Selektion der transfizierten Zellen statt. Der Erfolg der Transfektion bzw. der Transduktion wurde mikroskopisch dokumentiert.

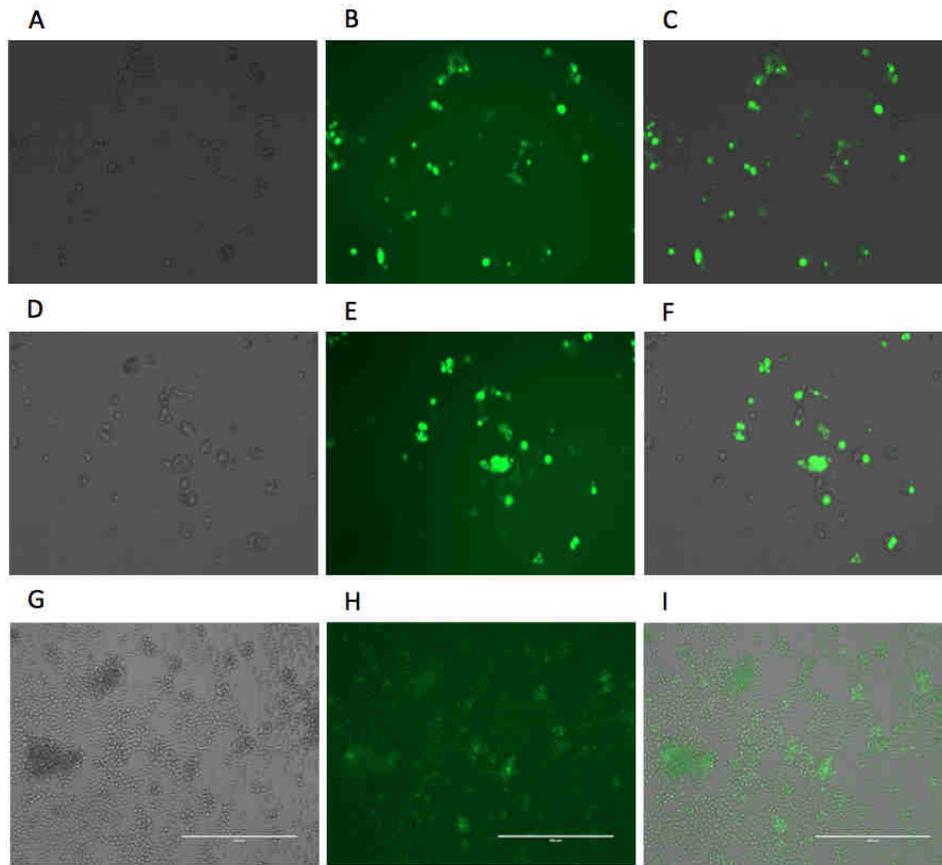


Abbildung 25: Transfektions- bzw. Transduktionskontrolle der HEK- bzw. sp2/0-Zellen. In den Spalten von links nach rechts sind das Durchlichtbild der Zellen (A, D, G), die Anregung durch Grünfluoreszenz (B, E, H) und der Overlay beider Bilder (C, F, I) gezeigt. Die HEK.T-Zellen wurden sowohl mit den pMXs-ATPFS2_ProtG-IP-Vektoren von PS3 (A-C) als auch mit dem von Bs (D-F) mittels jetPEI transfiziert. Für die Transduktion der sp2/0-Zellen wurden in einem ersten Schritt Platinium E-Zellen mit dem PS3-Konstrukt auf die gleiche Weise transfiziert. Nach 24 h wurden der Überstand dieser Zellen geerntet und in Volumina von 2 mL, 1 mL und 0,5 mL auf die Zielzellen gegeben. Für eine gesteigerte Transduktionseffizienz wurde zusätzlich 1 μ L Polybrene zu den Zellen gegeben. Nach der Infektion wurden die sp2/0-Zellen für 4 Tage im Inkubator kultiviert. Die Transduktionseffizienz der sp2/0-Zellen wurde mikroskopisch dokumentiert (G-I). Da kein eindeutiger konzentrationsabhängiger Effekt zu beobachten war, wurden nur die Zellen, die mit 2 mL des retroviralen Überstandes infiziert wurden dokumentiert.

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, verlief sowohl die Transfektion der HEK-Zellen mit pMXs-ATPFS2_PS3_ProtG-IP und pMXs-ATPFS2_Bs_ProtG-IP, als auch die Transduktion der sp2/0-Zellen mit pMXs-ATPFS2_PS3_ProtG-IP erfolgreich. Bei der Infektion der sp2/0-Zellen mit verschiedenen Volumina der retroviralen Überstände war kein konzentrationsabhängiger Effekt zu erkennen, weswegen mit den Zellen, die mit 2 mL des Überstands infiziert wurde, weitergearbeitet wurde.

Um eine quantitative Aussage über den Erfolg der Transfektion bzw. Transduktion machen zu können, wurden sowohl die transfizierten HEK-Zellen als auch die transduzierten sp2/0-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

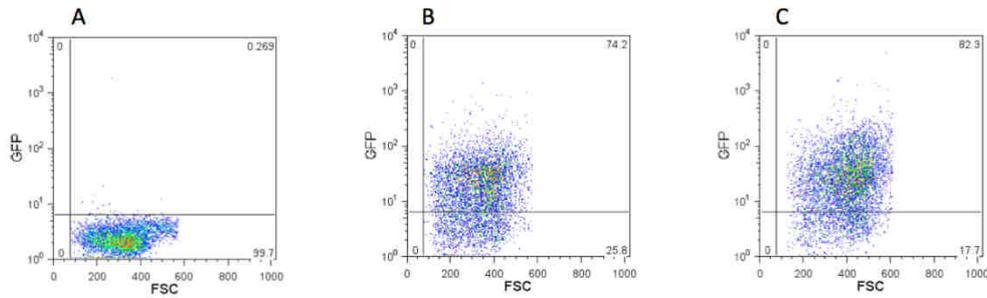


Abbildung 26: FACS-Analyse der mit ProteinG-Konstrukten transfizierten HEK-Zellen. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK.T-Zellen verwendet (A). Sowohl Bs- (B), als auch PS3-transfizierte Zellen zeigen eine Population im positiven Bereich mit 74 % bzw. 82 % grün fluoreszierenden Zellen. Allerdings kann die Population der erfolgreich transfizierten Zellen nicht klar von einer Population der nicht transfizierten Zellen abgegrenzt werden.

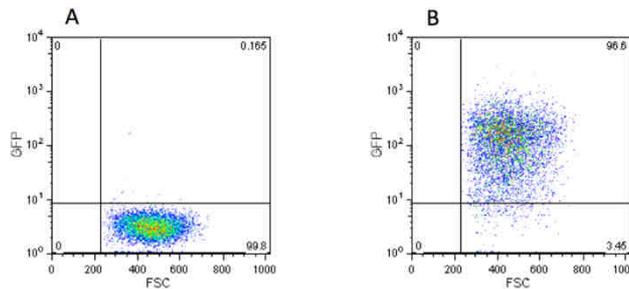


Abbildung 27: FACS-Analyse der mit pMXs-ATPFS2_PS3_ProtG-IP transduzierten sp2/0-Zellen. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte sp2/0-Zellen verwendet (A). Die transduzierten Zellen (B) waren zu etwa 97 % GFP-positiv, was auf eine fast vollständige Transduktionseffizienz schließen lässt

Aus den FACS-Analysen in Abbildung 26 wird deutlich, dass die Transfektion der transfizierten HEK-Zellen erfolgreich war. Bei den Bs- bzw. PS3-transfizierten Zellen ist eine GFP-positive Population von 74 bzw. 82 % zu erkennen. Allerdings ist die positive Population nicht eindeutig von einer negativen getrennt. Die Transfektionsanalyse der sp2/0-Zellen in Abbildung 27 zeigt, dass mit etwa 97 % GFP-positiven Zellen eine fast vollständige Transfektionseffizienz vorliegt.

5.3.2 In-Fusion® Klonierung von Nanobody-Tags

Neben dem ProteinG-Tag wurden als weitere Affinitäts-Tags die zwei Nanobodies s-14 und s+16 an das Sensorkonstrukt kloniert. Nanobodies, die auch als Einzeldomänenantikörper bezeichnet werden, sind von Antikörpern abgeleitete Proteine. Sie bestehen aus einer einzelnen isolierten variablen Domäne aus Schwerkettenantikörpern. Sie beinhalten viele Eigenschaften des Schwerkettenantikörpers, dem sie entstammen, einschließlich einer verlängerten CDR3-Aminosäuresequenz. Diese Sequenz ermöglicht es Nanobodies, im Vergleich zu konventionellen Antikörpern, eine Interaktion mit einer Vielzahl verschiedener Epitope³⁹. An den C-Terminus des Sensors in pMXs-IP_ATPFS2_PS3-IP wurde der s-14-

Nanobody kloniert. Der s+16-Nanobody wurden an den N-Terminus des Sensors in einen cytosolischen pCDNA3.1_ATPFS2_PS3-Vektor eingefügt. Beide Nanobodies binden mit hoher Spezifität an die ADP-Ribosyltransferase ARTC2 und können somit direkt und ohne zusätzliche Kopplung an einen Antikörper an die Oberfläche von ARTC2-exprimierenden Zellen gebracht werden.

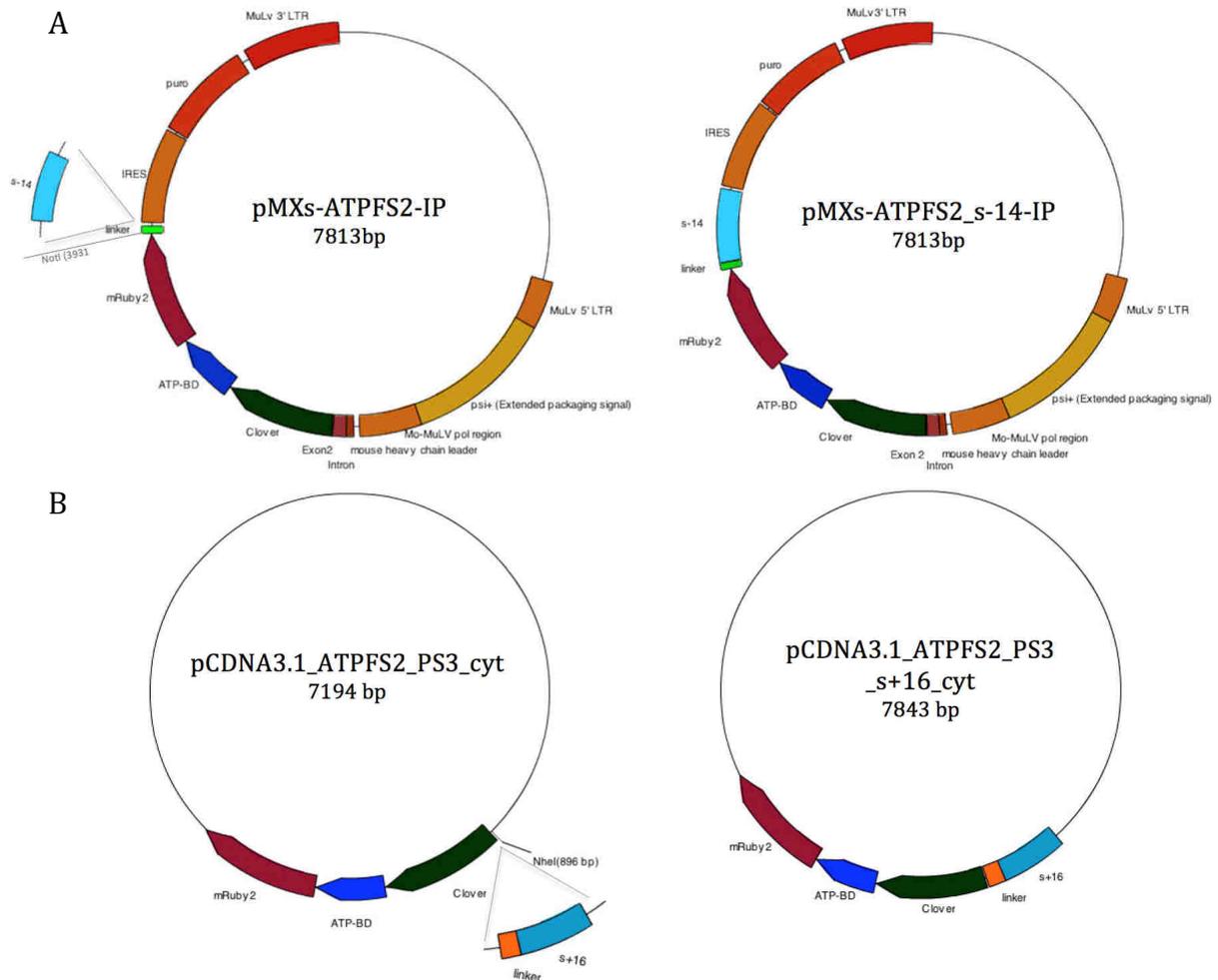


Abbildung 28: Schematische Darstellung der In-Fusion® Klonierung von pMXs-ATPFS2_s-14-IP und pCDNA3.1_ATPFS2_PS3_s+16_cyt. (A) Der Nanobody s-14 wurde am C-Terminus des Sensors im pMXs-ATPFS2_PS3-IP-Vektor eingefügt. Dafür wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym NotI linearisiert. Gleichzeitig wurde die Insert-Sequenz des s-14-Nanobodies unter der Verwendung der selbst entworfenen Primer INF_s-14-F_DoP und INF_s-14-R_DoP mittels PCR amplifiziert. (B) Der Nanobody s+16 wurde an den N-Terminus des Sensors in den cytoplasmatischen pCDNA3.1_ATPFS2_PS3-Vektor kloniert. Der Vektor wurde mit NheI linearisiert. Die Nanobodysequenz wurde mit den Primern INF_s+16-F_DoP und INF_s+16-R_DoP amplifiziert. Vektor- und Insert-Fragmente wurden nach der Auftrennung in einem 1 %-igen Agarosegel mit einander ligiert. Bild: (Dorothea Plundrich: 2014)

Vor der Klonierung wurden beide Vektoren enzymatisch linearisiert. Der pMXs-ATPFS2-IP-Vektor wurde hinter der Linkersequenz mit dem Restriktionsenzym NotI geschnitten. Bei dem pCDNA-Vektor wurde der Verdau mit NheI direkt vor der Clover-Domäne durchgeführt. Gleichzeitig wurden die Nanobody-Inserts mit dem jeweils entworfenen Primerpaar mittels PCR amplifiziert. Sowohl die linearisierten Vektoren als auch die amplifizierten Insert-

Fragmente wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, um die entsprechenden DNA-Banden herauszuschneiden.

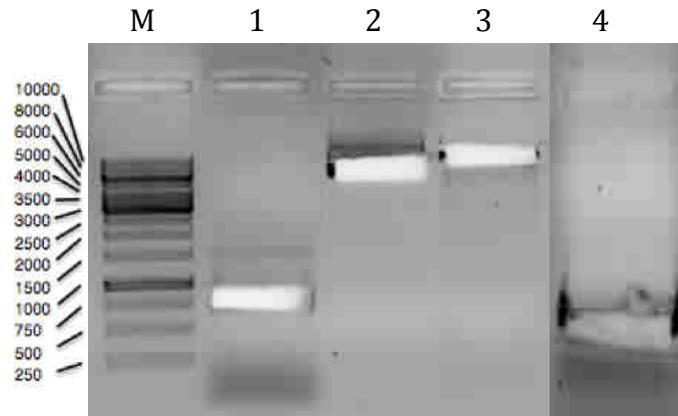


Abbildung 29: Elektrophoretische Auftrennung von Vektor- und Insertfragmenten. Die Banden wurden mit UV-Licht auf dem Gel sichtbar gemacht. In der Bande (M) wurde der Marker, GeneRuler 1kB, aufgetragen. Die Fragmente wurden entsprechend ihrer Höhe im Gel mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die beiden linearisierten Vektoren pCDNA3.1_ATPFS3_PS3_cyt und pMXs-ATPFS2_PS3-IP sind in den Banden (2) und (3) zu sehen. Die Insert-Fragmente s+16 sowie s-14 in den Banden (1) und (4).

Die Vektor- und Insert-Fragmente wurden mit dem In-Fusion® Enzym zu pMXs-ATPFS2_PS3_s-14-IP und pCDNA3.1_ATPFS2_PS3_s+16_cyt ligiert und im Anschluss in gewohnter Weise für die Sequenzierung aufbereitet. Um zu kontrollieren, ob die Proteine von Zellen sezerniert werden können, wurden beide Konstrukte durch eine jetPEI-Transfektion in HEK-Zellen eingebracht. Der Erfolg der Transfektion wurde mikroskopisch dokumentiert.

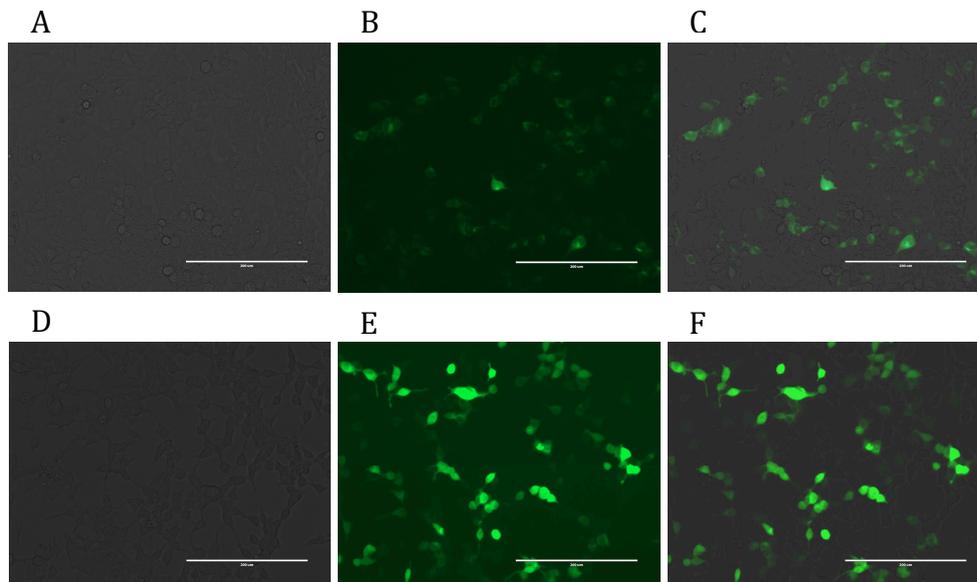


Abbildung 30: Mikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz der Nanobody-Sensorkonstrukte in HEK-Zellen. In den jeweiligen Spalten von links nach rechts sind das Durchlichtbild der Zellen (A&D), die Anregung durch Grünfluoreszenz (B&E) sowie der Overlay der beiden Bilder gezeigt (C&F). Die HEK-Zellen wurden sowohl mit pMXs_ATPFS2_PS3_s-14-IP (A-C) als auch mit pCDNA3.1_ATPFS2_PS3_s+16_cyt (D-F) mit Hilfe jetPEI transfiziert. Die Transfektion beider Konstrukte verlief positiv, wobei bei alleiniger Bewertung der Grünfluoreszenz der Zellen sichtbar ist, dass die Transfektion mit dem s+16-Konstrukt erfolgreicher war.

Wie in Abbildung 30 anhand der Grünfluoreszenz zu erkennen ist, verlief die Transfektion der HEK-Zellen sowohl mit pMXs-ATPFS2_PS3_s-14-IP als auch mit dem cytoplasmatischen pCDNA3.1_PS3_s+16-Vektor erfolgreich. Unter Betrachtung der Grünfluoreszenz lässt sich bei den s+16-transfizierten Zellen eine höhere Transfektionseffizienz vermuten. Zusätzlich zu dieser rein optischen Kontrolle wurde die Fluoreszenz der Zellen und somit die Transfektionseffizienz der Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen.

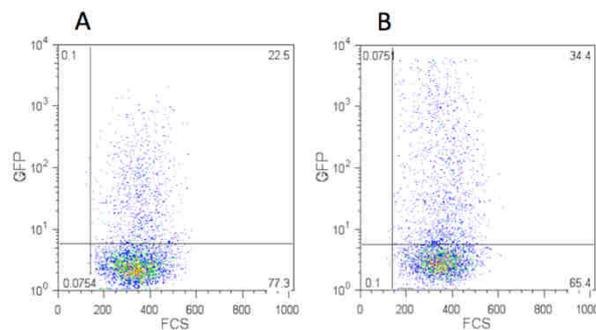


Abbildung 31: FACS-Analyse, der mit den Nanobody-Sensorkonstrukten transfizierten HEK-Zellen. Die Messung der Grünfluoreszenz zeigt, dass sowohl die mit s-14- (A) als auch die mit s+16-Konstrukten transfizierten HEK-Zellen (B) nur eine sehr geringe Anzahl an Zellen im GFP-positiven Bereich aufweisen. Beide besitzen eine sehr ungleichmäßig erfolgreich-transfizierte Zellpopulation von 23 % bzw. 35 %.

Die Messung der Zellen mittels Durchflusszytometrie zeigt, dass nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz von ca. 23 % bei s-14-transfizierten und etwa 35 % bei den s+16-transfizierten Zellen vorliegt. Die zuvor anhand der mikroskopischen Aufnahmen gemachte Aussage bestätigt sich allerdings, da auch in der FACS-Analyse s+16-transfizierte Zellen etwas positiver sind als die, die mit s-14-transfiziert wurden.

Trotz der schlechten Transfektionseffizienz wurden die Überstände der Zellen gesammelt, um eine Aussage über die Qualität der von den Zellen exprimierten Nanobody-Sensorkonstrukte machen zu können. Für diese Qualitätskontrolle wurden die Überstände der Zellen direkt an DC27.10 NOD-Zellen, welche in hohem Maße ARTC2 auf ihrer Oberfläche exprimieren, gekoppelt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Um die Spezifität der Nanobody-Konstrukte gegen ARTC2 zu bestätigen, wurden diese zusätzlich an DC27.10-Zellen gekoppelt, welche kein ARTC2 auf der Zelloberfläche tragen.

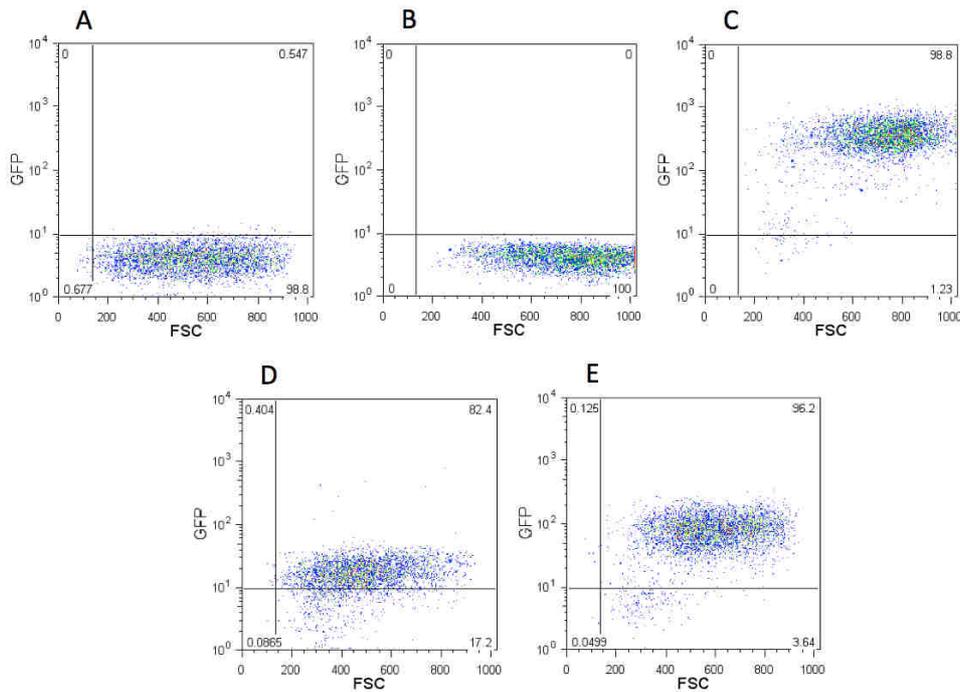


Abbildung 32: FACS-Analyse der Bindungsfähigkeit der klonierten Nanobody-Sensorkonstrukte. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte DC27.10 NOD-Zellen (A) und DC27.10-Zellen (B) verwendet. Letztere exprimieren kein ARTC2 auf der Oberfläche. Diese wurden mit dem s+16-Konstrukt gekoppelt. Für Positivkontrolle wurden die Zellen mit FITC-markiertem anti-ARTC2-Antikörper gekoppelt (C). Bei den Zellen die mit dem s-14-Sensorkonstrukt gekoppelt wurden zeigt sich eine schwach positive Population (D). Eine etwas stärkere Grünfluoreszenz ist bei den Zellen mit dem s+16-Sensorkonstrukt an der Oberfläche (E) zu erkennen.

Anhand der FACS-Analyse in Abbildung 32 wird deutlich, dass die In-Fusion® Klonierung der Nanobody-Konstrukte erfolgreich war und auch eine Bindungsfähigkeit der Nanobody-Sensorkonstrukte an die Zelloberfläche besteht. Durch die Kopplung der Sensoren an DC27.10-Zellen, die kein ARTC2 auf ihrer Oberfläche tragen, wird deutlich, dass durch die Nanobody-Tags eine Spezifität der Sensoren für ARTC2 hergestellt werden konnte, was eine direkte Kopplung an die Zelloberfläche möglich macht. Bei der Kopplung der Überstände an die Zellen zeigt sich auch, dass Zellen mit dem s+16-Sensorkonstrukt an der Oberfläche in der FACS-Analyse über eine höhere Grünfluoreszenz verfügt. Ob dies an der höheren Expression der Zellen lag oder an der besseren Qualität des Nanobody-Sensorskonstrukts muss weiter untersucht werden.

5.4 Produktionsanalyse verschiedener Zellsysteme

Neben der Klonierung neuer Sensorkonstrukte wurde auch die Expression eben dieser in verschiedenen Zellsystemen untersucht, um eine Produktion unter möglichst optimalen Bedingungen sicherzustellen. Neben den bewährten HEK-Zellen wurden verschiedene Sensoren sowohl in Maus Myelom-Zellen (sp2/0) als auch in super HEK-Zellen eingebracht, um diese auf ihre Produktionsfähigkeit zu untersuchen.

5.4.1 HEK-Zellen vs. sp2/0-Zellen

sp2/0 ist eine Myelom Zelllinie der Maus, die vielfach für die Produktion von Proteinen verwendet wird^{40,41}. Myelomzellen entstehen aus schadhafte B-Zellen, welche eine große Anzahl an Plasmazellen, den Myelomzellen, erzeugen. Diese Zellen sind in der Lage große Mengen an Immunglobulinen einer einzigen Art zu produzieren⁴². Für die Produktionsanalyse wurden die mit pMXs-ATPFS1_PS3_ProtG-IP-transfizierten HEK- bzw. sp2/0-Zellen verglichen.

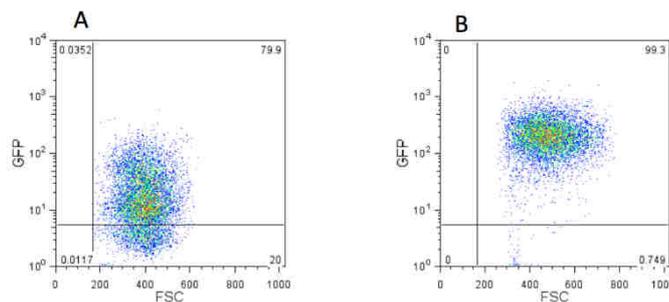


Abbildung 33: Direkter Vergleich von pMXs-ATPFS2_PS3_ProtG-IP-transfizierten HEK- und sp2/0-Zellen. Es sind Unterschiede in der Grünfluoreszenz der transfizierten Zelllinien zu erkennen. Die transfizierten HEK-Zellen (A) sind zu etwa 80 % GFP-positiv. Transfizierte sp2/0-Zellen (B) besitzen eine Transfektionseffizienz von fast 100 %.

In der FACS-Analyse in Abbildung 33 ist ein deutlicher Unterschied in der Sensorexpression zwischen den beiden Zellsystemen erkennbar. Die transfizierten HEK-Zellen besitzen zwar eine Population mit knapp 80 % GFP-positiven Zellen, allerdings ist keine deutliche Abgrenzung zu einer negativen Zellpopulation zu erkennen. Anders bei den sp2/0-Zellen. Diese sind fast komplett GFP-positiv, was auf eine hohe Sensorexpression schließen lässt.

Um auch eine Aussage über die Qualität der jeweils exprimierten Sensoren machen zu können wurden diese an die Oberfläche von DC27.10 NOD-Zellen gekoppelt. Da eine direkte Kopplung an die Zelle nicht möglich ist, wurden die Zellen vorher mit s-14-Rabbit-Fc gecoatet. Nachdem ungebundenes Rabbit-Fc durch Waschen mit PBS entfernt wurde, wurden die Überstände von pMXs-ATPFS2_PS3_ProtG-IP-transfizierten HEK- und sp2/0-Zellen aus

zwei Chargen auf die Zellen gegeben und mit diesen inkubiert. Gemessen wurde am Durchflusszytometer.

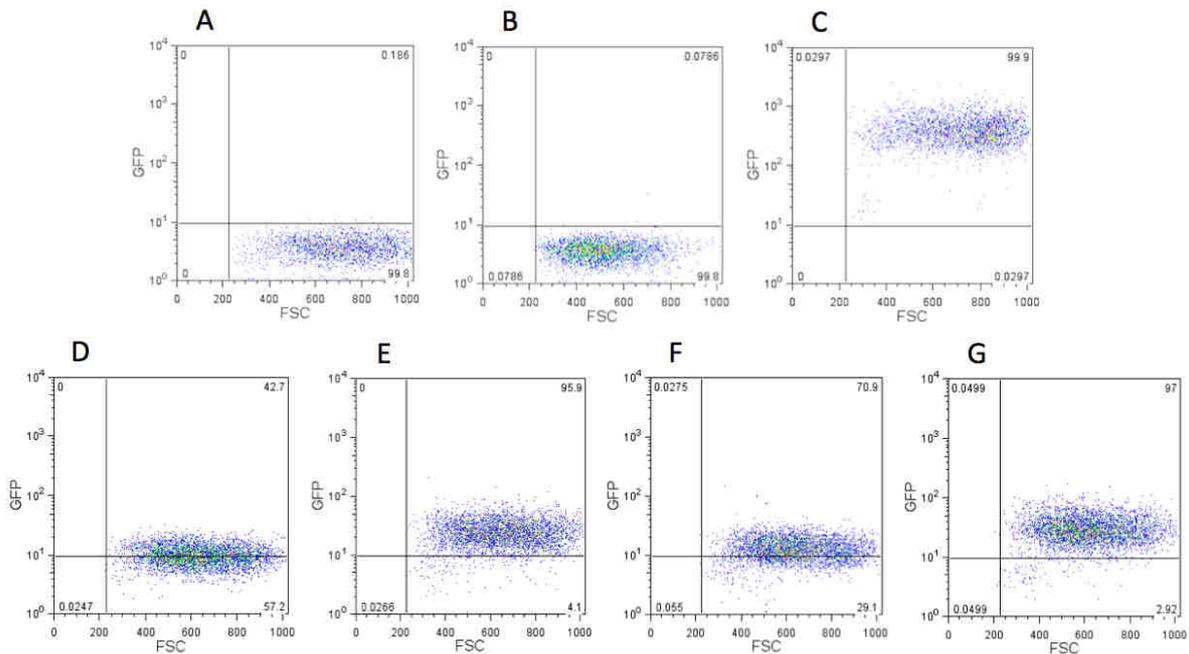


Abbildung 34: Qualitätsbewertung von Sensoren aus verschiedenen Zellsystemen durch Kopplung an die Zelloberfläche. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte DC27.10 NOD-Zellen verwendet (A). Als zusätzliche Negativkontrolle wurde ein Sensor ohne s-14-Rabbit-Fc auf die Zellen gegeben (B). Es fand keine Bindung des Sensors an die Zelloberfläche statt und somit ist auch keine Grünfluoreszenz zu sehen. Die Positivkontrolle (C) wurde zusätzlich zu s-14-Rabbit-Fc mit einem FITC-markierten Goat-anti-Rabbit Antikörper gekoppelt. Es wurden Zellüberstände verwendet, die am 16.10 (D&E), sowie am 20.10 (F&G) geerntet wurden. Die Zellen die mit HEK-Überständen gekoppelt wurden (D&F) zeigen eine leichte Grünfluoreszenz. Bei Zellen mit Sensoren aus sp2/0-Zellen (E&G) an der Oberfläche ist in beiden Fällen eine höhere Grünfluoreszenz zu erkennen.

In Abbildung 34 ist, im Vergleich zu den beiden verwendeten HEK-Überständen in beiden Fällen eine höhere Bindung der sp2/0-Überstände festzustellen. Die Ergebnisse aus den beiden FACS-Analysen von Abbildung 33 & 34 führen zu der Annahme, dass es sich bei der Myeloma-Zelllinie um ein zuverlässigeres Expressionssystem für die Sensorproduktion handelt, weswegen die Produktion der ATPFS2-Konstrukte in HEK-Zellen eingestellt wurde.

5.4.2 HEK-Zellen vs. Super-HEK-Zellen

Im Gegensatz zu HEK-Zellen sind Super-HEK-Zellen speziell auf Proteinproduktion ausgerichtete Zellen. Sie entstanden durch eine Transformation von HEK-Zellen mit dem nuclearen Antigen 1 des Epstein Barr Virus (EBV) kurz EBNA1, um eine stabile episomale Vermehrung von verschiedenen rekombinanten Vektoren durch eine sehr viel aktivere Promotorregion zu vermitteln. Super-HEK-Zellen sind zudem robust, sehr vielseitig einsetzbar und wachsen in serumfreiem Medium⁴³.

Für einen Vergleich der beiden Zellsysteme wurden sowohl HEK- als auch Super-HEK-Zellen mit dem ATPFS1-Sensor PS3 jetPEI-transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde zwei Tage nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop bewertet.

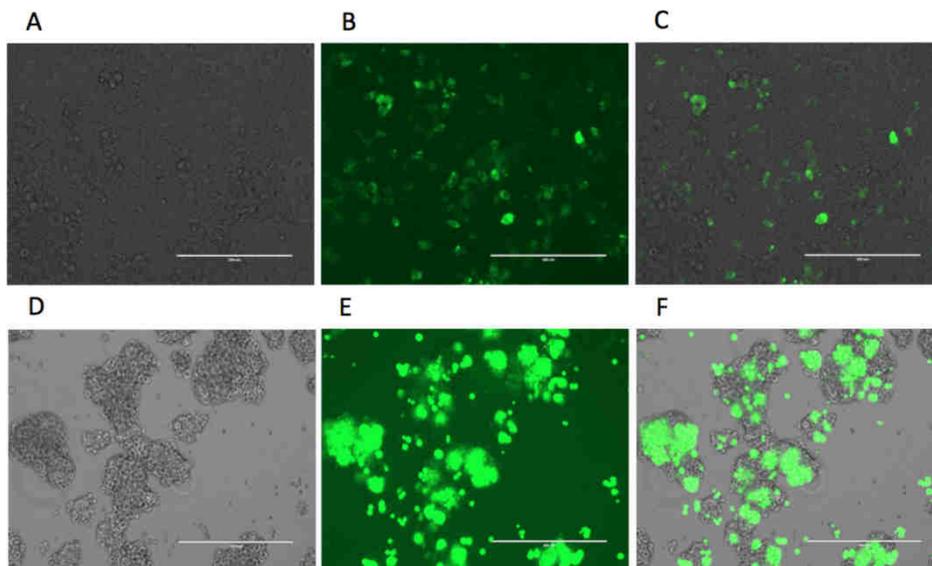


Abbildung 35: Mikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz von HEK- und Super-HEK-Zellen. In den Spalten von links nach rechts sind das Durchlichtbild (A&D), die Anregung der Zellen durch Grünfluoreszenz (B&E), sowie der Overlay der beiden Bilder (C&F) zu sehen. In der oberen Reihe (A-C) erkennt man die transfizierten HEK-Zellen mit nur einer leichten Grünfluoreszenz. In der unteren Reihe (E-F) ist die deutlich stärkere Fluoreszenz der Super-HEK-Zellen zu sehen, was für eine höhere Transfektionseffizienz dieser Zellen spricht.

Anhand der mikroskopischen Kontrolle in Abbildung 35 ist aufgrund der deutlich stärkeren Grünfluoreszenz der mit dem Sensorbaustein transfizierten Super-HEK-Zellen zu erkennen, dass die Transfektion dieser Zellen erfolgreicher verlaufen ist, als die der HEK-Zellen.

Da es sich bei dem Sensorbaustein um ein relativ instabiles Protein handelt, welches leicht durch Proteasen angegriffen und zerstört werden kann, wurden im nächsten Schritt

verschiedene PS3-Überstände aus HEK-, Super-HEK-, sowie aus sp2/0-Zellen auf ihre Qualität hin untersucht. Gleichzeitig sollte eine Möglichkeit zur Aufreinigung entwickelt werden. Dafür wurden Sepharose-Beads mit einem anti-GFP-Antikörper gekoppelt. Diese Aminolink-Beads dienten als Matrix, um die intakten Sensoren an ihre Oberfläche zu binden. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Überstände auf die Beads gegeben und mit diesen inkubiert. Nach Kopplung der Sensorproteine an die Beads wurde der Überstand mit ungebundenen Proteinen abgenommen und als Probe aufbewahrt. Nach mehreren Waschschrritten wurden die gebundenen Sensoren mittels SDS-Puffer von der Matrix eluiert. Die gesammelten Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Sensorproteine im Anschluss mit Hilfe eines Western Blots zu detektieren. Die Überstände der drei Zelltypen wurden jeweils in ihrer Ursprungsform, nach der Kopplung an die Beads, sowie nach der Elution der Sensoren auf ein SDS-Gel aufgetragen

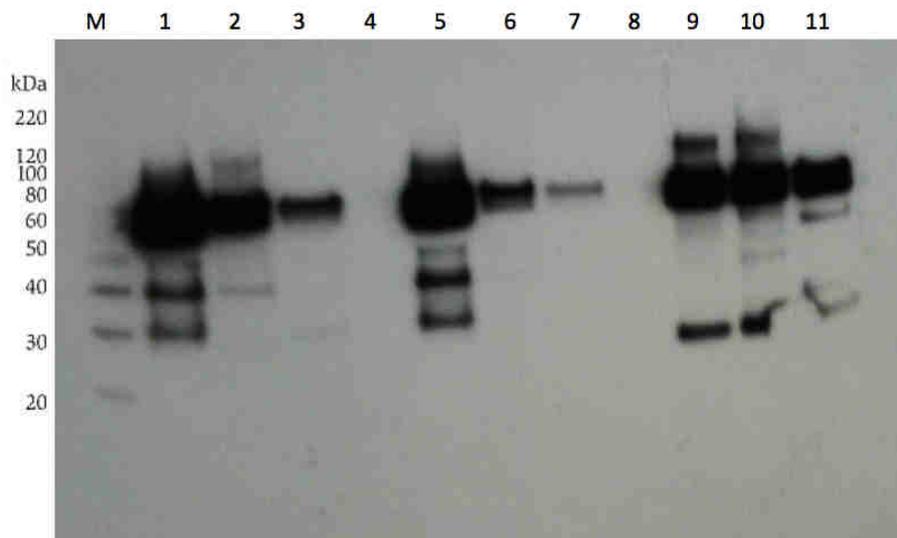


Abbildung 36: Darstellung verschiedener Aufreinigungsschritte des PS3-Sensors aus verschiedenen Zellsystemen durch einen Western Blot. Der Marker, MagicMark wurde in Bande (M) aufgetragen. Die Banden (1-3) zeigen die Sensoren in ihrem ursprünglichen Zustand vor der Aufreinigung. In den Banden (5-7) sind die ungebundenen Sensoren zu sehen, welche sich nach der Kopplung der Sensoren an die Beads noch im Überstand befanden. In den letzten drei Banden (9-11) erkennt man die Sensorproteine nach der Aufreinigung. Es wurden jeweils zuerst die Überstände der Super-HEK- (1,5,9), dann die der HEK- (2,6,10) und als letztes die der sp2/0-Zellen (3,7,11) aufgetragen.

In dem in Abbildung 36 dargestellten Western Blot sind die intakten Sensorproteine, wie erwartet, auf einer Höhe von etwa 70 kDa zu erkennen. Weitere große Banden sind auf der Höhe von 40 bzw. 30 kDa zu erkennen. Die in Bande 1 aufgetragenen Überstände aus den Super-HEK-Zellen, lassen im Vergleich zu denen aus den HEK- bzw. sp2/0-Zellen auf eine deutlich höhere Proteinexpression dieser Zellen schließen. Das zeigt sich auch in der Auftragung der ungebundenen Überstände in den Bahnen 5-7. Die Menge des von den Super-

HEK-Zellen produzierten Sensors war deutlich höher als die Aufnahmekapazität der Beads, weswegen sehr viele Sensoren ungebunden im Überstand zurückblieben. Dies ist auch bei den Überständen der HEK-Zellen zu beobachten, allerdings nicht in gleichem Ausmaß. Anders bei den von den sp2/0-Zellen produzierten Überständen. Hier waren die Sepharose-Beads in der Lage fast alle Sensoren an ihre Oberfläche zu binden.

Bei Betrachtung der Qualität der drei ursprünglichen Überstände zeigt sich, dass die Überstände der Super-HEK-Zellen zwar sehr viele intakte Sensorproteine, jedoch auch zersetzte Fragmente enthalten. Anders bei den von HEK- und sp2/0-Zellen produzierten Überständen, die einen sehr reinen Sensor enthalten. Bei den Banden der aufgereinigten Überständen sind vor allem bei den von Super-HEK-Zellen produzierten Sensoren große Unterschiede festzustellen. Die Banden der zerstörten Sensorfragmente sind, wie es scheint, durch die Aufreinigung entfernt worden. Allerdings ist bei den drei aufgereinigten Proben eine neue Bande auf der Höhe von etwa 25 kDa zu sehen, die weder bei der ursprünglichen Probe noch bei den ungebundenen Überständen zu sehen war.

5.5 Herstellung von Adenosin- und ATP-Sniffer-Zellen

5.5.1 Herstellung von ATP-reaktiven Sniffer-Zellen

Der Anstieg von extrazellulärem ATP und die daraus resultierende Aktivierung des P2X7-Rezeptors hat einen nachgeschalteten Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration zur Folge⁴⁴. Um diesen Kalzium Anstieg zu messen, wurden HEK-Zellen mit 1 µg des Cameleon-Sensors sowie 3 µg von verschiedenen Oberflächenrezeptoren wie folgt kotransfiziert.

Sensor		Rezeptor	
Cameleon	3 µL	P2X7	3 µL
Cameleon	3 µL	P2X1	2,9 µL
Cameleon	3 µL	ADORA3	2,3 µL
Cameleon	3 µL	CD62L	1,9 µL

Tabelle 1: Pipettierschema für die Kotransfektion von ATP-reaktiven HEK-Zellen. Für die Herstellung von ATP-reaktiven Sniffer-Zellen wurden HEK-Zellen mit dem Kalzium-Sensor Cameleon und verschiedenen Oberflächenrezeptoren kotransfiziert. Als Rezeptoren für ATP wurden P2X7 und P2X1 verwendet. Zusätzlich wurde die Zellen mit dem Adenosin-Rezeptor ADORA3, sowie als Negativkontrolle mit dem Zell-Adhäsions-Molekül CD62L kotransfiziert.

Die Zellen wurden drei Tage nach der Transfektion abzentrifugiert und in ECS-/- Puffer resuspendiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Änderung des FRET-Effekts vor

und nach der Zugabe von ATP und CADO aufgezeichnet. CADO (2-Chloradenosin) ist ein Adenosin-Analogon, welches vielfach verwendet wird um Adenosin-Rezeptoren zu aktivieren⁴⁵.

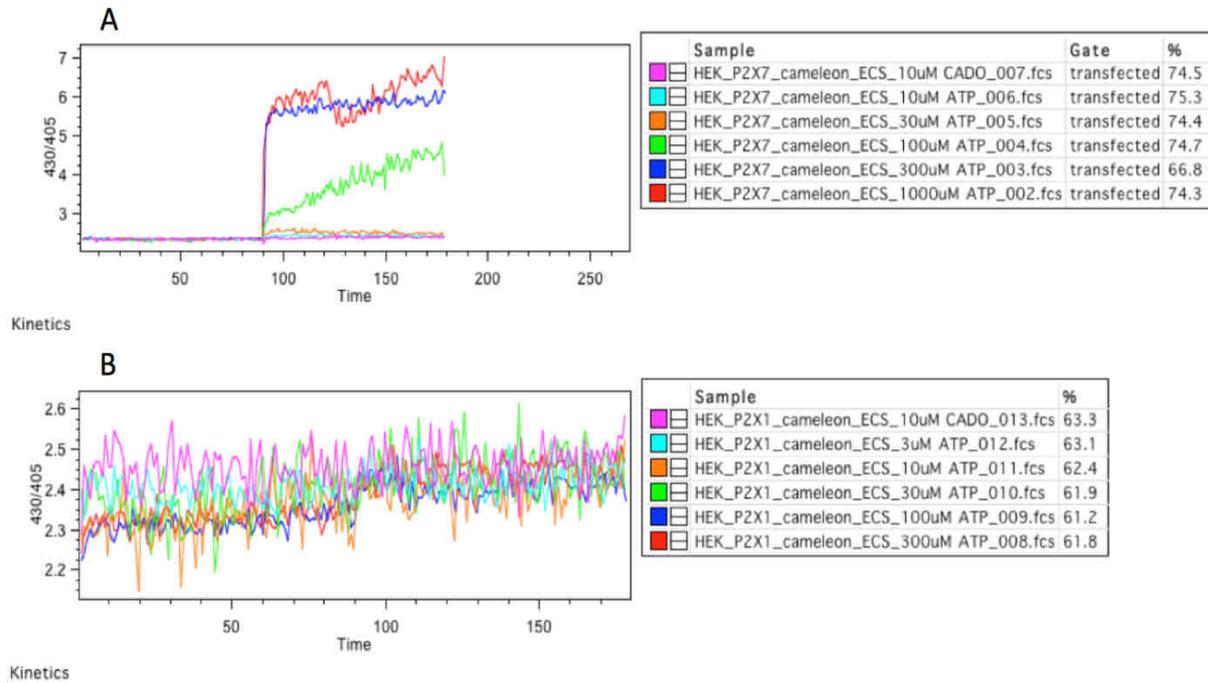


Abbildung 37: Darstellung der FRET-Kinetik vor und nach Zugabe von ATP. Vor der Zugabe von ATP wurde der Basis-FRET jeweils durch eine 90 Sekunden lange Messung eingestellt. Im Anschluss wurde ATP in Konzentrationen von 3-300 μM zu den Zellen pipettiert. In den Cameleon/P2X7-kotransfizierte Zellen(A), ist nach der Zugabe von ATP eine deutliche, konzentrationsabhängige Änderung des FRET-Effekts zu erkennen. Die mit P2X1-kotransfizierten Zellen(B) zeigen, trotz der Zugabe von verschiedenen ATP-Konzentrationen, keine vergleichbare Änderung. Es wurde jeweils die FRET-Ratio gegen die Zeit aufgetragen.

Der Versuch ergab nur für Cameleon/P2X7-kotransfizierte Zellen ein eindeutiges Ergebnis. Es war eine konzentrationsabhängige Änderung des FRET-Effekts festzustellen. Dieser Effekt blieb bei Zellen, die mit dem wesentlich sensitiveren¹¹ P2X1-Rezeptore kotransfiziert wurden, aus. Das FRET-Signal zeigt auch nach der Zugab von verschiedenen Konzentrationen ATP keinen Ausschlag.

5.5.2 Herstellung von Adenosin-reaktiven Sniffer-Zellen

Analog zu den ATP-detektierenden Zellen wurden Adenosin-Sniffer-Zellen hergestellt. Die Anwesenheit von extrazellulärem Adenosin führt hier durch die Aktivierung des mit der Adenylylcyclase gekoppelten A2A-Rezeptors zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration², welcher durch die Epac1/2-Sensorsysteme detektiert werden sollte. Dafür wurden HEK-Zellen sowohl mit jeweils einem der beiden Sensoren also auch mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren wie folgt kotransfiziert.

Sensor	Rezeptor
Epac1 0,4 µL	mouse A2A 4µL
Epac2 0,4 µL	mouse A2A 4 µL
Epac1 0,4 µL	human A2A 2,5 µL
Epac1 0,4 µL	human A2B 1,7 µL
Epac1 0,4 µL	CD62L 1,9 µL

Tabelle 2: Pipettierschema für die Kotransfektion von Adenosin-reaktiven HEK-Zellen. Für die Herstellung von Adenosin-reaktiven Sniffer-Zellen wurden HEK-Zellen mit den cAMP-Sensoren Epac1 bzw. Epac2 sowie verschiedenen Oberflächenrezeptoren für Adenosin kotransfiziert. Es wurden sowohl humane als auch murinae Adenosin-Rezeptoren verwendet. Als Negativkontrolle für die Adenosinrezeptoren wurde zusätzlich das Zell-Adhäsions-Molekül CD62L kotransfiziert.

Die Zellen wurden drei Tage nach der Kotransfektion abtrypsinisiert und in ECS-/- Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurde eine FACS-Messung durchgeführt, um die FRET-Kinetik vor und nach der Zugabe von Forskolin und CADO darzustellen. Forskolin aktiviert die Adenylylcyclase und führt somit zu einem Anstieg von intrazellulärem cAMP⁴⁶. CADO ist ein Adenosin-Analogon und wird deswegen häufig als Adenosin-Rezeptor-Agonist verwendet⁴⁵.

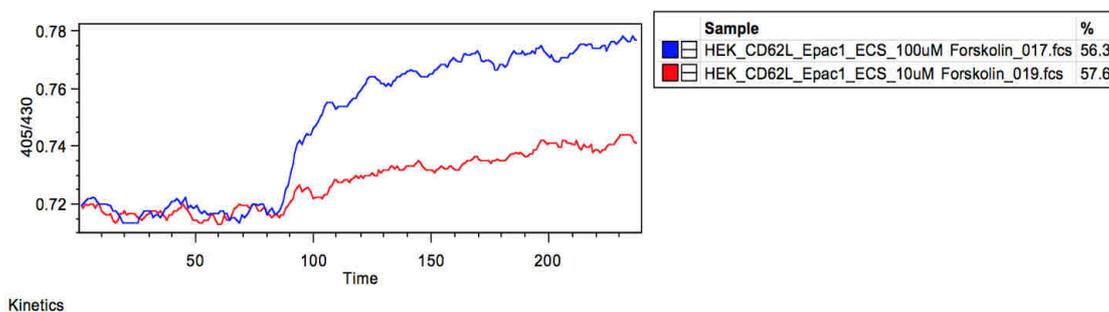


Abbildung 38: Konzentrationsabhängiger Effekt von Forskolin auf Epac1/CD62L kotransfizierte HEK-Zellen. Die transfizierten Zellen wurden 90 Sekunden mit dem FACS-Gerät gemessen um einen Basis-FRET einzustellen. Nach 90 s wurde Forskolin in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen pipettiert und die Änderung des FRET-Effekts über einen zeitlichen Verlauf von weiteren 90 Sekunden dokumentiert. Die rote Kurve stellt den Verlauf der FRET-Effizienz vor und nach der Zugabe von 10 µM Forskolin. Die blaue Kurve zeigt diesen Verlauf vor und nach der Zugabe von 100 µM Forskolin. Es wurde jeweils die FRET-Ratio gegen die Zeit aufgetragen.

Der Versuch ergab größtenteils sehr missverständliche Ergebnisse, die nicht ausgewertet werden konnten. Es konnte allerdings ein konzentrationsabhängiger Effekt von Forskolin auf Epac1/CD62L-kotransfizierte Zellen festgestellt werden.

5.5.3 Klonierung von bicistronischen Expressionskonstrukten

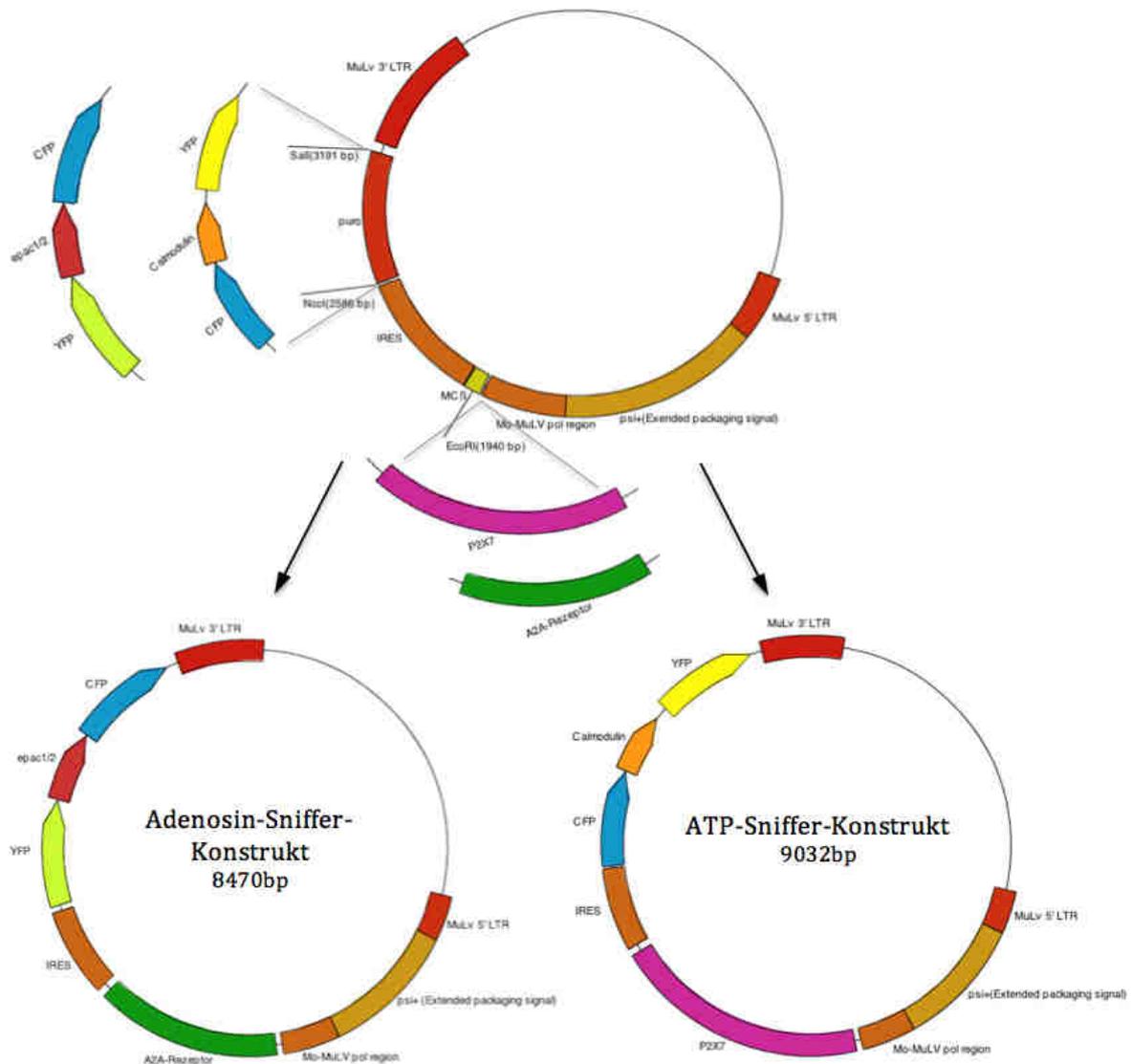


Abbildung 39: Klonierungsplan von ATP- bzw. Adenosin-Snifferkonstrukten. Für die Herstellung der Sniffer-Konstrukte wurde die Puromycinresistenz des pMXs-IP-Vektors durch Schneiden mit NcoI und SalI entfernt. An dieser Stelle wurden für die Adenosin-Sniffer-Konstrukte die Sensoren Epac1 und Epac2 eingefügt, für die ATP-Sniffer wurde die Puromycinresistenz durch den Cameleonsensor ersetzt. Für die Herstellung von bicistronischen Konstrukten wurden zusätzlich an einer EcoRI-Schnittstelle die Rezeptorsequenzen des A2A-Rezeptors für die Adenosin-, sowie die des P2X7-Rezeptors für die ATP-Sniffer, eingefügt. Bild: (Dorothea Plundrich, 2014)

Als Vorbereitung für die Herstellung der Adenosin-Sniffer-Zellen wurden die Epac1 und -2-Sensoren in den pMXs-IP-Vektor kloniert. Um die Sensorproteine an die Stelle der Puromycinresistenz in den Vektor zu bringen, wurden diese enzymatisch entfernt und durch einen der Sensoren ersetzt. Für den Doppelverdau wurden die Restriktionsenzyme NcoI und SalI verwendet. Zusätzlich wurden Epac1 und Epac2 mit dem zuvor entworfenen Primerpaar In-Fusion_pCDNA-F und In-Fusion_pCDNA-R amplifiziert. Wiederum wurden die Vektor- und Insert-Fragmente in einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt, um im Anschluss die passenden Banden aus dem Gel zu schneiden.

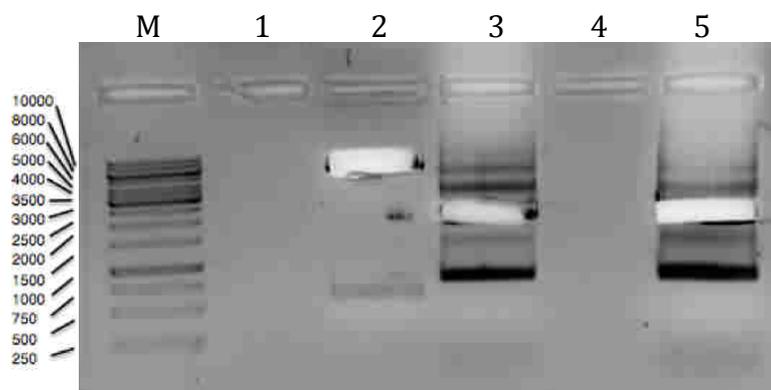


Abbildung 40: Elektrophoretische Auftrennung von Vektor und Insertfragmenten. Die einzelnen Banden wurden auf einer UV-Platte sichtbar gemacht. In der Bande (M) wurde der Marker GeneRuler 1kB aufgetragen. Der linearisierte Vektor pMXs-IP wurde in Bahn (6) aufgetragen. Sowohl der Vektor als auch die Insertfragmente Epac1 (3) und Epac2 (5) wurden anhand ihrer Höhe, mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten.

Die Banden wurden entsprechend ihrer Höhe im Gel mit Hilfe eines sterilen Skalpells herausgeschnitten und aufgereinigt. Vektor und Inserts wurden im Anschluss zu den neuen Vektoren pMXs-I-Epac1 und pMXs-I-Epac2 ligiert, welche auf gewohnte Weise aufbereitet und aufbewahrt wurden.

Neben den Epac1/2-Sensoren für die Adenosin-Sniffer-Zellen, wurde für die ATP-Sniffer-Zellen ein Cameleon-Sensor, ebenfalls an der Stelle der Puromycinresistenz in den pMXs-IP-Vektor eingebracht. Dafür wurde das Resistenzgen ebenfalls mit den Restriktionsenzymen NcoI und SalI herausgeschnitten. Gleichzeitig wurde das Insertfragment mit NcoI und XhoI geschnitten. Obwohl mit zwei verschiedenen Enzympaaren geschnitten wurde, ist eine Ligation später kein Problem, da SalI und NcoI im Bereich, in dem geschnitten wird, die gleiche Sequenz besitzen. Vektor und Insert werden nach dem Schneiden auf ein Agarosegel aufgetragen.

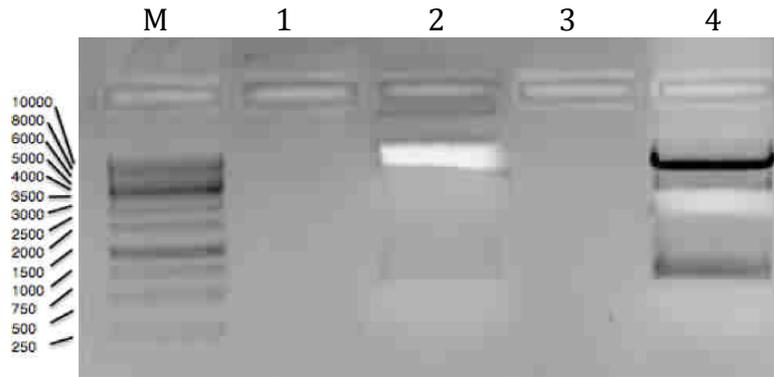


Abbildung 41: Elektrophoretische Auftrennung des pMXs-Vektor- und Cameleon-Fragments. Die Banden wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht. In der ersten Bande (M) wurde der Marker, GeneRuler 1kB aufgetragen. Sowohl das Vektor- (2), als auch das Insertfragment (4) wurden anhand ihrer Höhe im Gel ausgeschnitten und später aufgereinigt.

Sowohl der linearisierte pMXs-IP-Vector, als auch das Cameleon-Insert wurden entsprechend ihrer Höhe aus dem Gel geschnitten. Die DNA wurde mittels Gelaufreinigung isoliert. Vektor und Insert wurden anschließend zu pMXs-I-Cameleon ligiert. Dieses Konstrukt wurde auf die gewohnte Weise aufbereitet und gelagert.

Die Herstellung der bicistronischen Sniffer-Konstrukte durch Einfügen der Rezeptorsequenzen von A2A und P2X7 in den jeweiligen Vektor, konnte für diese Arbeit nicht mehr fertiggestellt werden und wird Teil eines neuen Projekts sein.

6 Diskussion der Ergebnisse

6.1 Analyse von ATPFS1 transfizierten HEK-Zellen

Für die Optimierung der mit ATPFS1-Konstrukten transfizierten HEK-Zellen, wurden diese mit Hilfe ihrer Zeocin-Resistenz, durch Zugabe von Zeocin bei jeder Passage unter ständigem Selektionsdruck gehalten. Zusätzlich wurden positiv transfizierte Zellen anhand ihrer Grünfluoreszenz mittels FACS-Sorting selektiert. Diese Sortierung verlief erfolgreich. Die FACS-Analyse (Abbildung 18) der gesorteten Zellen zeigte, dass alle Transfektanten im Bereich von 96-99 % GFP-positiv waren und somit das gewünschte Sensorprotein produzierten. Es konnte keine 100 %-ige Transfektionseffizienz erzielt werden, da keine klonale Selektion, also kein Einzelzellsorting stattfand. Bei einem Einzelzellsorting werden die Zellen einzeln in eine 96-Well-Platte sortiert, um sich dort zu vermehren. Dadurch würde ermöglicht werden, dass sich tatsächlich nur Zellen vermehren, die das Sensorgen in sich tragen. Durch die hier verwendete Sortingmethode bestand also, trotz der Selektion nach der Grünfluoreszenz die Möglichkeit, dass sich auch wenige untransfizierte Zellen unter den positiv Selektierten ATPFS1-Zellen befanden, die sich später weiter vermehrten.

6.2 In-Fusion® Klonierungen

Für das Klonieren von PCR-Produkten gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die in dieser Arbeit verwendete In-Fusion® Klonierung ist eine Ligase-unabhängige Klonierungstechnik. Diese Art von restriktionsloser Klonierung ermöglichte es, verschiedene PCR-Produkte in jede beliebige Klonierungsstelle innerhalb eines Vektors einzufügen, ungeachtet der Tatsache, ob diese Stellen auch in dem zu klonierenden Insert vorhanden sind⁴⁷. Die vom Hersteller beworbene Klonierungseffizienz bestätigte sich dadurch, dass die mit den In-Fusion®-Ligationsprodukt transformierten XL2-blue Bakterien ein deutlich besseres Kolonienwachstum zeigten, als Bakterien die mit regulär klonierten Sensorkonstrukten transformiert wurden.

6.3 In-Fusion® Klonierung verschiedener Nanobody-Tags zur Kopplung der Sensoren an die Zelloberfläche

Um die Sensoren für die Messung von Nukleotiden an die Zelloberfläche zu bringen, wurden zwei verschiedene Nanobody-Tags an den C- bzw. N-Terminus der Sensorproteine gebracht. Nanobodies besitzen eine ähnliche Größe wie die ebenfalls als Tag verwendete ProteinG-Domäne und verfügen über eine Spezifität für ARTC2. Diese Spezifität ist bei beiden verwendeten Nanobodies vergleichbar hoch, wie durch mehrere Experimente der AG für molekulare Immunologie am UKE bestätigt werden konnte. Bei dem durchgeführten Kopplungsversuch (Abbildung 32) zeigte sich eine etwas höhere Bindungsfähigkeit der s+16-Sensorkonstrukte im Vergleich zu den Sensoren die den s-14-Nanobody an ihrem C-Terminus trugen. Die naheliegendste Erklärung dafür könnte in den unterschiedlichen Transfektionseffizienzen liegen, die bei den s+16-transfizierten Zellen etwas höher war als bei denen, die das s-14-Sensorkonstrukt in sich trugen. Der Unterschied in der Transfektionseffizienz und damit der Sensorexpression könnte auf die unterschiedliche Konformation der beiden Nanobody-Sensorkonstrukte zurückzuführen sein. Die Tatsache, dass der Tag einmal am C-Terminus und einmal am N-Terminus des Sensors angebracht wurde, könnte ein Grund dafür sein, dass der Sensor unterschiedlich gut von den Zellen in den Überstand sezerniert werden kann. Um eine eindeutige Erklärung für die hier erkennbaren Unterschiede zu geben, müssen weitere Erfahrungswerte durch zusätzliche Experimente gesammelt werden.

6.4 Produktionsanalyse verschiedener Zellsysteme

Die schnelle und effiziente Produktion, der in dieser Arbeit verwendeten Sensorproteine, stellte eine der größten Herausforderungen dar. Für die Anwendung dieser rekombinanten Sensorproteine war es wichtig, dass diese in möglichst reiner Form und hoher Konzentration von den jeweiligen Zellsystemen exprimiert wurden. Es wurden eukaryotische Zellsysteme, denen prokaryotischen Ursprungs vorgezogen. Obwohl prokaryotische Systeme bereits in der Lage sind mit hoher Effizienz zu produzieren⁴⁸, haben die hier verwendeten Zelllinien große Vorteile im Bezug auf den Ertrag und die Produktqualität. Ein zusätzlicher Vorteil war, dass eukaryotische Zellen einen erweiterten Apparat für die Faltung, Sekretion und post-translationalen Modifikation von Proteinen besitzen⁴³. Die humane Kidney Zelllinie HEK wird vielfach für transiente oder stabile Proteinexpressionen verwendet, da sie äußerst effizient mit Plasmid-DNA transfiziert werden kann⁴³. HEK-Zellen stammt aus menschlichem,

embryonischem Gewebe und wurden durch die DNA von Adenovirus 5 umgewandelt⁴⁹. Zusätzlich wurden für die Proteinproduktion sogenannte Super-HEK-Zellen, sowie die Zellen einer Maus Myelom Zelllinie, sp2/0-Zellen, verwendet. Super-HEK-Zellen wurden entwickelt um die Produktion von rekombinanten Proteinen zu verbessern und enthalten eine sehr viel aktivere Promotorregion als HEK-Zellen, was die Proteinexpression in diesen Zellen erhöhte⁴³.

Anhand des Western Blots (Abbildung 36) war zu erkennen, dass Super-HEK-Zellen im Vergleich zu HEK-Zellen tatsächlich über eine deutlich höhere Proteinexpression verfügen. Zusätzlich zu der sehr ausgeprägten Bande, die bei den Super-HEK-Zellen den intakten Sensor auf der Höhe von 70 kDa darstellten, waren auf der Höhe von 40 und 30 kDa noch zwei weitere Banden zu erkennen. Unter Berücksichtigung der einzelnen Sensorbestandteile und deren Größe wurde deutlich, dass es sich bei der Bande auf der Höhe von etwa 40 kDa um die ATP-Bindedomäne, welche nur noch über eine der beiden Fluorophordomänen verfügt, handelte. Bei der darunter liegenden 30 kDa-Bande handelte es sich dementsprechend um eine monomere Fluorophordomäne. Ob bei Super-HEK-Zellen aufgrund der Anwesenheit dieser Banden, die offensichtlich die Abbauprodukte des Sensors darstellen, auf einen weniger reines Protein geschlossen werden kann, ist zu bezweifeln, da aufgrund der höheren Sensorkonzentration auch mehr Abbauprodukte anfallen. Für eine tatsächliche Aussage über die Reinheit von Sensoren aus verschiedenen Expressionssystemen müssten alle in gleicher Konzentration vorliegen. Dies könnte zum Beispiel durch eine Titration des Super-HEK-Überstands auf ein Gel erreicht werden, um diesen im Anschluss in einer vergleichbaren Konzentration zu den HEK-, bzw. sp2/0-Überständen zu erhalten.

Dass alle Banden (Abbildung 36, Banden 9, 10, 11) des aufgereinigten Überstands die gleiche Größe hatten, bestätigt die Annahme, dass die Beads ab einer bestimmten Menge an gebundenen Sensoren gesättigt waren und demnach nicht mehr Proteine an ihrer Oberfläche binden konnten. Bei der zusätzlichen Bande, die in den aufgereinigten Überständen auf der Höhe von etwa 25 kDa zu sehen war, könnte es sich um die C-terminale YFP-Domäne des Sensors handeln. Diese Fluorophordomäne ist sehr homolog zu GFP und könnte somit ebenfalls durch den an die Sepharose-Beads gekoppelten anti-GFP-Antikörper aus dem Überstand gebunden und später eluiert worden sein. Warum diese nicht auf der gleichen Höhe von etwa 30 kDa zu sehen war wie die Banden monomerer Fluorophordomänen der unaufgereinigten bzw. ungebundenen Sensorproteine ist unklar. Diese Bande war nur bei den

von transfizierten HEK-, bzw. Super-HEK-Zellen produzierten Überständen deutlich zu sehen, da diese beiden Zelltypen die PS3-Variante von ATPFS1 produzieren. Die von den sp2/0-Zellen produzierten ATPFS2-PS3-Konstrukte enthalten an ihrem C-Terminus statt YFP den Fluorophor mRuby2, welcher möglicherweise von anti-GFP nicht in gleichem Maße erkannt wurde.

Generell kann auf Basis der erhaltenen Ergebnisse die Aussage gemacht werden, dass das Expressionssystem der Super-HEK-Zellen für eine weitere Produktion der Sensoren wohl am vielversprechendsten ist. Gleichzeitig verlief die Aufreinigung über eine Aminolink-Matrix mit anti-GFP erfolgreich. Ob bei dieser Aufreinigung mittels anti-GFP immer damit gerechnet werden muss, dass ein GFP-ähnliches Monomer mit eluiert wird, muss durch Wiederholen des Versuchs sicher gestellt werden.

6.5 Herstellung von Adenosin- und ATP-Sniffer-Zellen

6.5.1 Herstellung von ATP-reaktiven Sniffer-Zellen

Der Versuch lieferte nur für die Cameleon/P2X7-kotransfizierten Zellen ein eindeutiges Ergebnis. Hier konnte ein deutlicher konzentrationsabhängiger Effekt festgestellt werden (Abbildung 37), der ab einer Konzentration von 100 μM ATP zu einem sichtbaren Anstieg des FRET-Effektes führt. In der Hoffnung, einen sensitivitätssteigernden Effekt zu erzielen, wurde der Cameleon-Sensor in diesem Experiment nicht nur mit P2X7, sondern auch mit einem zweiten ATP-Rezeptor namens P2X1 kotransfiziert. P2X1 reagiert sehr viel empfindlicher auf ATP als P2X7. Für eine Aktivierung des Rezeptors genügen schon ATP-Konzentrationen von 0,05-1 μM . P2X7 reagiert erst ab ATP-Konzentrationen von 100-800 μM ¹¹. Der aufgrund dieser Eigenschaften erwartete Anstieg der FRET-Effizienz stellte sich bei Cameleon/P2X1-kotransfizierten Zellen allerdings nicht ein. Dies könnte auf den generellen Versuchsaufbau zurückzuführen sein. Zwischen der Aufnahme des Basis-FRET und der Messung der FRET-Kinetik nach der Zugabe von ATP entstand eine Verzögerung von etwa 5-10 Sekunden. Dies bedeutete, dass die Aufzeichnung der Kinetik nicht unmittelbar vom Augenblick der ATP-Zugabe, sondern leicht zeitversetzt begann. Im Falle des P2X1-Rezeptors könnte dies bedeuten, dass sich zu Beginn der Messung, aufgrund der hohen Reaktivität des Rezeptors, die Kalzium-Kanäle bereits wieder geschlossen haben und somit keine Veränderung mehr stattfand, die aufgezeichnet werden konnte. Ein zusätzliches

Problem bei dieser Art von Messung entsteht dadurch, dass nicht nur die Fluoreszenz einer einzelnen Zelle gemessen wurde, sondern die mittlere Fluoreszenzintensität von mehreren tausend Zellen gleichzeitig aufgezeichnet wurde. Sind diese nicht vollständig synchron, kann keine eindeutige Kinetik erstellt werden. Eine mikroskopische Einzelzellmessung könnte in diesem Fall möglicherweise ein genaueres Bild dokumentieren.

6.5.2 Herstellung von Adenosin-reaktiven Sniffer-Zellen

Die Kofunktions der Epac1/2-Sensoren mit verschiedenen Adenosin-Rezeptoren brachte ebenfalls kaum verwertbare Ergebnisse, was auf verschiedene Ursachen zurückzuführen war. Einerseits kamen nach zweifacher Durchführung des Versuches Zweifel an der Identität der verwendeten Rezeptoren auf. Um diese eindeutig sicherzustellen, wurden die Rezeptorplasmide sequenziert und es bestätigte sich, dass es sich bei dem verwendeten Mouse A2A-Rezeptor in Wirklichkeit um einen Glutamat-Rezeptor handelte. Gleichzeitig ist fragwürdig, ob eine Analyse mittels Durchflusszytometrie wirklich die optimale Methode ist, um die FRET-Kinetik nach Aktivierung der Rezeptoren aufzunehmen. Eine mikroskopische Einzelzellmessung könnte möglicherweise ein genaueres Bild der FRET-Kinetik liefern.

Es konnte durch dieses Experiment allerdings bestätigt werden, dass die Epac-Sensoren in der Lage sind einen Anstieg von cAMP aufzuzeichnen (Abbildung 38). Durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen des Adenosin-Analogons Forskolin wurde eine Aktivierung der Adenylylcyclase bewirkt und der daraus resultierende Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration als Änderung des FRET-Signals aufgezeichnet. Die allgemeine Kenntnis über die Funktionalität der verwendeten Sensoren ist neben den ansonsten wenig aussagekräftigen Ergebnissen allerdings eine gute Grundlage für ein weiteres Arbeiten mit diesen Sensortypen. Eine Aussage über generelle Unterschiede zwischen Epac1 und Epac2 kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht gemacht werden.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die Anwesenheit von extrazellulären Nukleotiden hat weitreichende Folgen auf die Zellen des Immunsystems, wobei die durch diese Nukleotide vermittelten Reaktionen sehr unterschiedliche Folgen für den Organismus haben können. So vermittelt extrazelluläres ATP in Verbindung mit dem P2X7-Rezeptor meist pro-inflammatorische Reaktionen, wohingegen Adenosin durch Aktivierung des A2A-Rezeptors meist anti-inflammatorisch wirkt.

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet das Phänomen, bei dem Energie strahlungslos von einem fluoreszierenden Donor- auf ein Akzeptormolekül übertragen wird. Eine Energieübertragung findet nur dann statt, wenn sich Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe zueinander befinden. Diese Eigenschaft wird durch den Aufbau, der in dieser Arbeit verwendeten Sensoren ausgenutzt, der es ermöglicht, die Konzentration von verschiedenen Metaboliten (ATP, Kalzium und cAMP) durch eine Änderung des FRET-Effekts darzustellen. Die Bindung eines dieser Metaboliten an den jeweiligen Sensor induziert eine Konformationsänderung, die bewirkt, dass sich der Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül entweder verringert oder vergrößert und somit zu einem Anstieg oder Abfall der FRET-Effizienz, abhängig von der Konzentration des gebundenen Liganden, führt.

Zu Beginn der Arbeit sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, die bereits etablierten ATP-Sensoren der Gruppe von Hiromi Imamura, für eine Messung der lokalen ATP-Konzentration, möglichst effektiv an die Oberfläche von Zellen zu koppeln. Dafür wurden die Sensorproteine mit verschiedenen Tags versehen, die entweder direkt oder indirekt in der Lage waren an die Zelloberfläche zu binden. Es wurden sowohl ein ProteinG-Tag als auch zwei verschiedene Nanobody-Tags verwendet, die entweder am C- oder N-Terminus des Sensorproteins angebracht wurden. Die Funktionalität dieser Tags konnte durch FACS-Analysen bestätigt werden, für eine tatsächliche Bewertung der Vor- und Nachteile der einzelnen Tags müssen allerdings noch weitere Ergebnisse gesammelt werden.

Auf der Suche nach einem möglichst effizienten Expressionssystem für die Sensoren wurden drei verschiedene Zelllinien mit den Sensorproteinen transfiziert und auf ihre Produktionseigenschaften hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass Super-HEK-Zellen rein quantitativ das beste Expressionssystem darstellen. Gleichzeitig wurde an einer Aufreinigungsmethode gearbeitet, um die Qualität der Sensorkonstrukte zu verbessern. Unter Einsatz eines anti-GFP-Antikörpers, welcher an die Oberfläche von Sepharose-Beads

gekoppelt wurde, war es möglich die intakten Sensorproteine in fast reiner Form aus dem Zellüberstand zu isolieren.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit an einem weiteren Detektionssystem auf Basis der FRET-Sensoren Epac1/2 und Cameleon gearbeitet, den Adenosin- bzw. ATP-Sniffer-Zellen. Erste Versuche, Adenosin- bzw. ATP-reaktive Sniffer-Zellen herzustellen, lieferten allerdings nur sehr wenige verwertbare Ergebnisse. Es konnten allerdings Informationen über die allgemeine Funktionalität der verwendeten Sensorproteine gewonnen werden.

Gleichzeitig wurde an der Herstellung von bicistronischen Sniffer-Konstrukten gearbeitet, welche sich zum Abschluss dieser Arbeit noch in der Klonierungsphase befanden.

In dieser Bachelorarbeit wurde eine Grundlage für die Entwicklung verschiedener Detektionssysteme für extrazelluläre Nukleotide geschaffen. In einem nächsten Schritt soll nun, durch Einfügen der jeweiligen Rezeptoren, die Klonierung der bicistronischen Sniffer-Konstrukte vollendet werden. Für die Herstellung von Adenosin- bzw. ATP-Sniffer-Zellen sollen im Anschluss an die Klonierung, Fibroblasten, mit den jeweils entstandenen Konstrukten, stabil transfiziert werden. Der Plan ist es, diese Zellen in einer dünnen Schicht auf einem Objektträger zu platzieren. Dort sollen sie in Kontakt mit Nukleotid-sekretierenden Zellen einen Anstieg von Adenosin bzw. ATP mikroskopisch darstellbar machen. Es soll dadurch eine Bewertung von verschiedenen Umständen, unter denen es zu einer erhöhten Adenosin- bzw. ATP- Ausschüttung kommen kann, möglich gemacht werden.

Für eine zuverlässigere Anwendung der ATPFS1 bzw. -2-Konstrukte muss durch zusätzliche Versuche sichergestellt werden, welcher der klonierten Tags sich am besten eignet, um die Sensoren an die Zelloberfläche zu koppeln. Um ein möglichst reines Sensorprotein zu erhalten, muss weiterhin an einer Verbesserung der bisher verwendeten Aufreinigungsmethode gearbeitet werden.

Die Bindung eines dieser Metaboliten an den jeweiligen Sensor induziert eine Konformationsänderung, die dazu führt dass sich der Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül entweder verringert oder erhöht und somit zu einer Änderung des FRET-Effekts führt.

Literaturverzeichnis

1. Kouzaki, H., Iijima, K., Kobayashi, T., O'Grady, S. M. & Kita, H. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J. Immunol.* **186**, 4375–87 (2011).
2. Haag, F. *et al.* Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signal.* **3**, 71–81 (2007).
3. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Janeway's Immunobiology 8th edition.* 1–26 (2012).
4. Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**, 299–309 (2000).
5. Sala, A., Ferrari, D., Virgilio, F. Di, Idzko, M. & Norgauer, J. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 339–343 (2003).
6. Rissiek, B., Haag, F., Boyer, O., Koch-Nolte, F. & Adriouch, S. ADP-Ribosylation of P2X7: A Matter of Life and Death for Regulatory T Cells and Natural Killer T Cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **384**, 107–26 (2015).
7. Wiley, J. S., Sluyter, R., Gu, B. J., Stokes, L. & Fuller, S. J. The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens* **78**, 321–32 (2011).
8. Di Virgilio, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal.* **1**, 205–9 (2005).
9. Robinson, L. E., Shridar, M., Smith, P. & Murrell-Lagnado, R. D. Plasma Membrane Cholesterol as a Regulator of Human and Rodent P2X7 Receptor Activation and Sensitization. *J. Biol. Chem.* (2014). doi:10.1074/jbc.M114.574699
10. Cronstein, B. N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *Br. Rev.* **8**, (1994).
11. Bours, M. J. L., Swennen, E. L. R., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N. & Dagnelie, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* **112**, 358–404 (2006).
12. Coade, S. B. & Pearson, J. D. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ. Res.* **65**, 531–537 (1989).
13. Haanes, K. a, Schwab, A. & Novak, I. The P2X7 receptor supports both life and death in fibrogenic pancreatic stellate cells. *PLoS One* **7**, e51164 (2012).
14. Ferrari, D. *et al.* The P2X 7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *J. Immunol.* (2014). doi:10.4049/jimmunol.176.7.3877

15. Lee, B. H. *et al.* Activation of P2X(7) receptor by ATP plays an important role in regulating inflammatory responses during acute viral infection. *PLoS One* **7**, e35812 (2012).
16. Kumar, V. & Sharma, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur. J. Pharmacol.* **616**, 7–15 (2009).
17. Chern, Y., Chiou, J.-Y., Lai, H.-L. & Tsai, M.-H. Regulation of Adenylyl Cyclase Type VI Activity During Desensitization of the A2a Adenosine Cyclic AMP Response : Role for Protein Phosphatase. *Mol. Pharmacol.* **48**, 1–8 (1995).
18. Sitkovsky, M. V & Ohta, A. The “danger” sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol.* **26**, 299–304 (2005).
19. Raskovalova, T. *et al.* Gs Protein-Coupled Adenosine Receptor Signaling and Lytic Function of Activated NK Cells. *J. Immunol.* **175**, 4383–4391 (2005).
20. Thiel, M., Caldwell, C. C. & Sitkovsky, M. V. The critical role of adenosine A 2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. **5**, 515–526 (2003).
21. Haskó, G., Csóka, B., Németh, Z. H., Vizi, E. S. & Pacher, P. A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation. *Trends Immunol.* **30**, 263–70 (2009).
22. Ohta, A. *et al.* A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13132–7 (2006).
23. Bar-Yehuda, S. *et al.* Adenosine Receptors and Cancer. *NIH Public Access* **193**, (2009).
24. Sitkovsky, M. V *et al.* Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 657–82 (2004).
25. Lam, A. *et al.* Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *NIH Public Access* **9**, 1005–1012 (2013).
26. Jares-Erijman, E. a & Jovin, T. M. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1387–95 (2003).
27. Selvin, P. R. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Am. Inc.* **7**, (2000).
28. Landa, L. R. *et al.* Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *J. Biol. Chem.* **280**, 31294–302 (2005).
29. Imamura, H. *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based. **106**, 15651–15656 (2009).
30. Palmer, A. E. & Tsien, R. Y. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat. Protoc.* **1**, 1057–65 (2006).

31. Ko, S.-K., Chen, X., Yoon, J. & Injea, S. Zebrafish as a good vertebrate model for molecular imaging using fluorescent probes. *Chem Soc Rev* **30**, 2120–2130 (2011).
32. Börner, S. *et al.* FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nat. Protoc.* **6**, 427–38 (2011).
33. Nikolaev, V. O. & Lohse, M. J. Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells. *Physiology (Bethesda)*. **21**, 86–92 (2006).
34. Pangrsic, T. *et al.* Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J. Biol. Chem.* **282**, 28749–58 (2007).
35. Haas, B. *et al.* Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves. *Cereb. Cortex* **16**, 237–46 (2006).
36. Miller, A. D., Miller, D. G., Garcia, J. V. & Lynch, C. M. Use of Retroviral Vectors for Gene Transfer and Expression. *Methodes Enzymol.* **217**, (1993).
37. Bjorck, L. & Kronvall, G. PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF STREPTOCOCCAL PROTEIN G , A NOVEL IgG-BINDING REAGENT '. *J. Immunol.* (1984).
38. Sjobringso, U., Bjorcksli, L. & Kasternll, W. Streptococcal Protein G. *J. Biol. Chem.* **266**, 399–405 (1991).
39. Pardon, E. *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* (2014). doi:10.1038/nprot.2014.039
40. Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewsky, K. A New Mouse Myeloma Cell Line that Has Lost Immunoglobulin Expression but Permits the Construction of Antibody-Secreting Hybrid Cell Lines Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : A N E W M O U S E M Y E L O M A CELL LINE . *J. Immunol.* 22–25 (2014).
41. Peterson, A. C. & Wong, G. G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* (1978).
42. Matsui, W. *et al.* Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *NIH Public Access* **103**, 2332–2336 (2012).
43. Jäger, V. *et al.* High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **13**, 52 (2013).
44. Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. & Dubyak, G. R. Nonclassical IL-1 Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *J. Immunol.* **179**, 1913–1925 (2007).
45. Bastin-Coyette, L. *et al.* Mechanisms of cell death induced by 2-chloroadenosine in leukemic B-cells. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1451–60 (2008).

46. Landa, L. R. *et al.* Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *J. Biol. Chem.* **280**, 31294–302 (2005).
47. Algire, M. A. *Restrictionless Cloning. Laboratory Methods in Enzymology: DNA* **529**, 125–134 (Elsevier Inc., 2013).
48. Leandro, P., Lechner, M. C., Tavares de Almeida, I. & Konecki, D. Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system. *Mol. Genet. Metab.* **73**, 173–8 (2001).
49. Aiello, L., Guilfoyle, R., Huebner, K. & Weinmann, R. Adenovirus5 DNASEquences Present and RNASEquencesTranscribed in Transformed Human Embryo Kidney Cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology* **469**, 460–469 (1979).
50. Arend, W. P., Palmer, G. & Gabay, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol. Rev.* **223**, 20–38 (2008).
51. Libby, P. & Alerts, E. Generation of Biologically Active IL-1 β by Matrix Metalloproteinases: A Novel Caspase-1-Independent Pathway of IL-1 β Processing. *J. Immunol.* (2014).
52. Wang, Y. *et al.* Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* **434**, 772–7 (2005).

Abbildungsverzeichnis

1. Schematische Darstellung der Immunabwehr im menschlichen Körper.....	2
2. Schematische Darstellung des Zusammenspiels zwischen extrazellulären Purin-Nukleotiden und Immunzellen	4
3. Pro-inflammatorischer Effekt durch Prozessierung von IL-1 β und IL-18	5
4. Schematische Darstellung von Adenosin-Rezeptoren und ihrer Kopplung mit der Adenylylcyclase.....	6
5. Übersicht über Stoffwechselweg von Adenosin im Körper	7
6. Schematische Darstellung einer FRET-Aktivierung zwischen dem Fluorophorenpaar CFP und YFP am Beispiel eines Sensors	9
7. Schematische Zeichnung eines ATP-Sensors des Typs ATPFS1	10
8. Grafische Darstellung der Fluoreszenzspektren der beiden verwendeten Donor-Akzeptor-Paare	11
9. Schematische Darstellung des Cameleon-Sensorproteins zur Detektion von Kalzium.....	12
10. Schematische Zeichnung eines cAMP-Sensorproteins.....	13
11. Schematische Darstellung der Aktivierung von Sniffer –Zellen durch extrazelluläres ATP und Adenosin	14
12. Schematischer Ablauf einer In-Fusion-Klonierung.....	33
13. Skizzierter Aufbau einer Blottingkammer für Western Blots	38
14. Mikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz der HEK-ATPFS1-Zellen	41
15. FACS-Analyse der mit ATPFS1-Sensoren transfizierten HEK-Zellen	42
16. FACS-Sorting-Kriterium.....	42
17. Mikroskopische Kontrolle der sensorexprimierenden HEK-Zellen nach dem Sorting	43
18. FACS-Analyse der mit ATPFS1-transfizierten HEK-Zellen nach dem Sorting	43
19. Sortitration zur Messung der Bindungskapazität von DC27.10 NOD-Zellen	44
20. Grafische Auswertung der FACS-Analyse von Abbildung 19.....	45
21. Schematische Darstellung der Klonierung von pMXs-ATPFS2-IP	46
22. Elektrophoretische Auftrennung des geschnittenen pMXs-IP-Vektors und der ATPFS2-Inserts	47
23. Schematische Darstellung der In-Fusion-Klonierung von pMXs-ATPFS2-ProtG-IP..	48
24. Elektrophoretische Auftrennung der pMXs-ATPFS2-IP-Vektoren PS3 und Bs, sowie des ProteinG-Inserts	49
25. Transfektions- bzw. Transduktionskontrolle der HEK- bzw. sp2/0-Zellen.....	50
26. FACS-Analyse der mit ProteinG-Konstrukten transfizierten HEK-Zellen.....	50
27. FACS-Analyse der mit pMXs-ATPFS2_PS3_ProtG-IP transduzierten sp2/0-Zellen..	51
28. Schematische Darstellung der In-Fusion-Klonierung von pMXs-ATPFS2_s-14-IP und pCDNA3.1_ATPFS2_PS3_s+16_cyt	52
29. Elektrophoretische Auftrennung von Vektor- und Insertfragmenten	53
30. Mikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz der Nanobody-Sensorkonstrukte in HEK-Zellen	53
31. FACS-Analyse der mit den Nanobody-Sensorkonstrukten transfizierten	

HEK-Zellen.....	54
32. FACS-Analyse der Bindungsfähigkeit der klonierten Nanobody-Sensorkonstrukte	55
33. Direkter Vergleich von pMXs-ATPFS2_PS3_ProtG-IP-transfizierten HEK- und sp2/0-Zellen.....	56
34. Qualitätsbewertung von Sensoren aus verschiedenen Zellsystemen durch Kopplung an die Zelloberfläche.....	57
35. Mikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz von HEK- und Super-HEK-Zellen.....	58
36. Darstellung verschiedener Aufreinigungsschritte des PS3-Sensors aus verschiedenen Zellsystemen durch Western Blot.....	59
37. Darstellung der FRET-Kinetik vor und nach Zugabe ATP	61
38. Konzentrationsabhängiger Effekt von Forskolin auf Epac1/CD62L kotransfizierte HEK-Zellen	62
39. Klonierungsplan von ATP- bzw. Adenosin-Snifferkonstrukten	63
40. Elektrophoretische Auftrennung von Vektor und Insertfragmenten	64
41. Elektrophoretische Auftrennung des pMXs-Vektor- und Cameleon-Fragments.....	65

Tabellenverzeichnis

1. Pipettierschema für die Kotransfektion von ATP-reaktiven HEK-Zellen.....	60
2. Pipettierschema für die Kotransfektion von Adenosin-reaktiven HEK-Zellen.....	62

Anhang

Gefahrenstoffhinweise

Stoffname	Gefahrenzeichen	Gefahrensätze
Dithiothreitol		H: 302-315-319 P: 302+352-305+351+338
Ethanol		H: 225 P: 210
Trypan Blau		P: 201-308+313
Natrium Cyanoborohydrid	  	H: 228-300-310-330-314-410 P: 210-260-264-273-280-284

H:350

H- und P-Sätze

H-Sätze

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H300	Lebensgefahr bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H350	Kann Krebs erzeugen.
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

P-Sätze

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P210	Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P260	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
P264	Nach Gebrauch gründlich waschen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
P284	Atenschutz tragen.
P302+352	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P305+351+338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lange behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P308+313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mir beim Erstellen dieser Bachelorarbeit zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Friedrich Haag, der mich bei der Bearbeitung dieses interessanten Themas betreute. Bedanken möchte ich mich dabei vor allem für seine immer freundliche und konstruktive Unterstützung, sowie die Bereitschaft, sich geduldig meinen Fragen zu stellen.

Mein außerordentlicher Dank gilt außerdem Prof. Dr. Oliver Ullrich für die Betreuung meiner Arbeit, viele Ratschläge und sein stets überaus freundliches Entgegenkommen.

Unter allen Menschen mit denen ich zusammenarbeiten durfte, möchte ich Gudrun Dubberke ganz besonders hervorheben. Sie war diejenige, die mich mit großer Geduld mit sehr vielen, der in dieser Arbeit verwendeten Methoden vertraut gemacht hat.

Für die wunderbare laborübergreifende Zusammenarbeit, zahlreiche Ratschläge sowie viele fachliche sowie freundschaftliche Gespräche, möchte ich mich bei Philine Bergmann, Thomas Eden, Anna Eichhoff, Carolina Pinto, Sana Javed, Stephan Menzel, Dennis Niewiadomski, Lena Schwinger sowie allen anderen Bewohnern des IFI-Landes bedanken. Besonders möchte ich an dieser Stelle Rebecca Cornelis erwähnen, mit der ich während meiner Zeit im UKE sehr intensiv zusammenarbeiten durfte.

Meinen Eltern danke ich für ihre immerwährende Unterstützung und Geduld während meines Studiums. Meinen Geschwistern Sigrid, Harald, Gudrun und Isabell für ihren moralischen Beistand und aufbauenden Worte. Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei meiner Schwester Gudrun, die mir durch ihre Erfahrung eine große Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit war.

Zusätzlich möchte ich mich bei meinen Freunden für ihre großartige emotionale Unterstützung bedanken. Hervorzuheben sind hierbei Nadine Radermacher, Fabrice Viol und Christian Grüttner, die mir bei der Korrektur und Diskussion dieser Arbeit eine überaus große Hilfe waren.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Dorothea Plundrich, an Eides statt, dass die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Einsatz von FRET-basierten Sensoren zur lokalen Detektion von Nukleotid-Konzentrationen auf der Zelloberfläche“, selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt worden ist. Alle Inhalte die direkt oder indirekt aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind als solche im Literaturverzeichnis kenntlich gemacht. Dies gilt sowohl für den Textinhalt als auch für alle in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen und Skizzen.

Ort, Datum

Unterschrift: Dorothea Plundrich